

00322

79



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACIÓN DEL CICLO CELULAR
DE UNA NUEVA MUTANTE EN EL GEN
CDC25 DE *Saccharomyces cerevisiae*"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A

ALEJANDRA HERNÁNDEZ BARRERA

DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE NIETO SOTELO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Envío a la Dirección General de Bibliotecas:
DINAM a difundir en formato electrónico e impreso
Contenido de mi trabajo recepción:
NOMBRE: Alejandra Hernández Barrera
FECHA: 2 Junio 2003
FIRMA: [Firma]

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

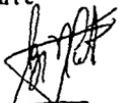
Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
Caracterización del ciclo celular de una nueva mutante en el gen CDC25
de Saccharomyces cerevisiae

realizado por **Alejandra Hernández Barrera**

con número de cuenta **9432884-0**, quien cubrió los créditos de la carrera de:

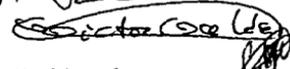
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis **Dr. Jorge Nieto Sotelo** 
 Propietario

Propietario **Dr. Jorge Luis Folch Mallo** 

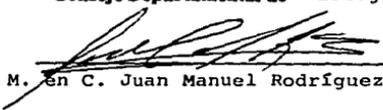
Propietario **Dr. Miguel Lara Flores** 

Suplente **Dr. Víctor Manuel Valdés López** 

Suplente **M. en IBB. Claudia Andrea Segal Kischinevzky** 

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología


 M. en C. **Juan Manuel Rodríguez Chávez**



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

B

*Dedico esta tesis a mi madre,
quien siempre me ha apoyado incondicionalmente
para realizar mis sueños.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Nieto Sotelo por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol por su ayuda y asesoría para la realización de esta tesis.

A Luz María Martínez por su apoyo técnico.

A la Dra. Ivonne Rosenstein y a su equipo de trabajo por su apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A la Bióloga Zamira Anahí Ávila Valle por su apoyo técnico en la parte de bioestadística.

A Larissa Ventura por su apoyo técnico en la realización de este trabajo de investigación.

A DGAPA por la confianza y apoyo para la realización de este trabajo, que se encuentra incluido en el proyecto DGAPA-UNAM IN209599.

Agradezco:

Todo el apoyo que mi familia me ha brindado, principalmente a Rocío, a mis "hermanos" Fabián y Víctor y a mi querida gran abuela, a quien admiro y respeto. A mi querida tía Lucía Núñez, por todo su amor y por abrirme las puertas de su casa en todo momento.

A Jordi, por su enorme paciencia y por apoyarme en todo a lo largo de la realización de esta tesis, ya que sin su ayuda no hubiera podido terminarla. A Luzma, por su gran cariño y confianza y por todo lo que pude aprender a su lado. A la Dra. Ivonne Rosenstein por su gran apoyo para realizar esta tesis.

A mi pequeña family (Larissita, Aurora y Carfitos) y Don Corleone por todas las aventuras que pasamos juntos, y vaya que aventuras! Por todas esas sesiones nocturnas hablando de proteínas y servaduras entre otros dilemas existenciales, además de soportar todos mis dramas y enseñarme a ser tolerante.

A Larissa y Aurora por todo lo que hemos compartido: vinos, comidas, over 2 days, música, alegrías y frustraciones. Así como la gran amistad que hemos forjado a lo largo de estos años, y los que faltan!

A Zamira por su gran amistad, su confianza, su enorme paciencia y apoyo en todas mis locuras. Por su gran ayuda para terminar esta tesis. Y por muchas otras cosas mas...

A Enrique, por escucharme pacientemente y por todos sus consejos y el gran cariño que siempre me ha brindado. A Fernando, porque seguimos siendo amigos.

A Putito, Nino, Diego, Pili, Tripa, El Chino, Tico, y los que faltan, por todas esas noches de ska.

A Manuel, por todos los momentos que alguna vez compartimos.

A Toña, por el gran cariño y paciencia que siempre me ha tenido.

A Mayte y Mari por su apoyo incondicional y el gran cariño que me tienen. A Bibis, Emmanuel y Rose por esos días tan agradables en el laboratorio.

A mis viejos y nuevos amigos en Cuernavaca: Odis, Sonita, Erwin, Karla, Tigger, Diente, Alvaro, Delany, Monica y Gabriel quienes me han ayudado a sobrevivir la transición entre la licenciatura y la maestría.

A Pedro por ser mi guía espiritual y mi gran amigo.

A mi querido Rafael por demostrarme que las sorpresas aún existen y por ayudarme a cerrar este ciclo para continuar con el siguiente.

Agradezco a todos aquellos que me han acompañado a lo largo de esta gran aventura, la licenciatura, y con quienes me he divertido y he aprendido muchísimo.

RESUMEN

La vía Ras-cAMP está involucrada en el control de la proliferación particularmente con base a la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y la resistencia al estrés. Esta vía es activada por el producto del gen *CDC25* cuyo producto es un intercambiador de nucleótidos GDP - GTP de Ras. La proteína Cdc25 es requerida para la producción de cAMP.

En el presente trabajo se analizó el ciclo celular de una nueva mutante del gen *CDC25* actualmente denominada *cdc25-21*. Esta mutante presenta niveles de termotolerancia muy elevados en todas los períodos de crecimiento, incluso en la fase postdiáuxica. Cuando, en general, en estos estadios de crecimiento la cepa silvestre es muy sensible a temperaturas letales.

La mutante *cdc25-21* codifica una proteína Cdc25 truncada, a la cual le faltan 612 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (del aminoácido 978 al 1589) región en donde reside el dominio catalítico. A diferencia de las mutantes obtenidas por Van Aelst *et al.* (1990), que no son capaces de crecer en glucosa cuando les falta la parte carboxilo terminal, la mutante *cdc25-21* sigue siendo viable en glucosa a pesar de que le falta esta región. Además esta mutante presenta niveles de termotolerancia muy elevados en todas los períodos de crecimiento, incluso en la fase postdiáuxica. Cuando, en general, en estos estadios de crecimiento son muy sensibles a temperaturas letales.

También presenta un fenotipo de colonia pequeña que cosegrega con la alta termotolerancia intrínseca que posee. Sin embargo, este fenotipo puede revertir. Estudios preliminares indican que un 2 % de la población revierte, y la mayor parte adquiere un tamaño de colonia similar al de la cepa silvestre. El análisis genético de las revertantes ha demostrado que posiblemente se trata de una supresión extragénica mas que una reversión del mismo locus.

Los resultados de los estudios del ciclo celular, a nivel del ciclo citoplasmático y del ciclo cromosomal, de la cepa mutante *cdc25-21* (JF337), mostraron que existe una alteración en el ciclo celular de esta cepa ya que presenta una fase G0 /G1 más larga. En estudios posteriores se demostró que todas las células *cdc25-21* tienen una fase G1 más larga que la normal pero no entran en G0 durante la fase exponencial.

El trastorno del ciclo celular de la cepa mutante *cdc25-21* posiblemente se debe a que la alteración del gen *CDC25* repercute en el funcionamiento de la vía Ras -cAMP y a su vez sobre la traducción de las ciclinas de la fase G1, que junto con Cdc28 permiten el paso a través del punto de inicio.

Considerando que el fenotipo de colonia pequeña de la mutante *cdc25-21* puede revertir adquiriendo un tamaño de colonia similar a la cepa silvestre, se realizó un análisis de la frecuencia de reversión de este fenotipo.

En un estudio anterior, realizado por Casas - Flores (1998) se determinó que la frecuencia de reversión de la cepa mutante ScIBT2, de la cual proviene la mutante *cdc25-21*, es de 7×10^{-3} , un porcentaje considerablemente mayor al fenómeno de reversión espontánea que ha sido reportado (1×10^{-9} a 1×10^{-6}). El análisis realizado por Casas fue un estudio cuantitativo de este fenómeno en cultivos en fase logarítmica. En este trabajo se rediseñó la metodología para determinar la frecuencia de reversión de la mutante *cdc25-21* de forma cuantitativa. Para ello se analizó la tasa de reversión durante el crecimiento por colonia. Sin embargo, debido a la alta tasa de contaminación y la escasas de muestras los resultados no permiten definir algún comportamiento del proceso de reversión.

RESUMEN

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
EL CICLO CELULAR	2
Generalidades.....	2
Puntos de regulación o verificación en el ciclo celular.....	3
CICLO CELULAR DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	5
Características generales.....	5
Regulación del ciclo celular.....	6
VÍA RAS - cAMP.....	8
Componentes de la vía Ras - cAMP.....	8
Regulación de la respuesta al estrés	9
Regulación del crecimiento.....	11
Control del ciclo celular.....	12
ANTECEDENTES	13
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
HIPÓTESIS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Cepas.....	16
Medios de cultivo	16
Condiciones de crecimiento.....	16
Determinación del número de colonias con el contador automático COV/ASLAM.....	17
DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE REVERSIÓN.....	18
Micromanipulación	18
Obtención de colonias, dilución y siembra.....	18
Cuantificación del porcentaje de reversión	18
Análisis estadístico: Prueba de T.....	19
ANÁLISIS DEL CICLO CITOPASMÁTICO.....	19
Soluciones.....	19
Cuantificación de las células gemantes y no gemantes en la cámara de Neubauer.....	20
Análisis estadístico: Análisis de varianza	21
ANÁLISIS DEL CICLO CROMOSOMAL	21
Soluciones.....	21
Filtración de las soluciones y los medios.....	23
Establecimiento de cultivos sincrónicos con la hormona de apareamiento	23
Fijación de muestras para cuantificar el DNA	24
Tinción del DNA.....	24

<i>Pruebas de disgregación</i>	25
<i>Disgregación de las muestras</i>	26
<i>Programas y citómetro de flujo</i>	26
<i>Parámetros utilizados en el citómetro de flujo</i>	26
RESULTADOS	27
<i>Determinación de la frecuencia de reversión</i>	27
ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.....	29
<i>Análisis del ciclo citoplasmático</i>	29
<i>Análisis del ciclo cromosomal</i>	33
<i>Determinación del tiempo de arresto de los cultivos con factor α</i>	34
<i>Cuantificación del DNA en el citómetro de flujo</i>	37
DISCUSIÓN	41
DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE REVERSIÓN.....	41
ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.....	42
<i>Análisis del ciclo citoplasmático</i>	43
<i>Análisis del ciclo cromosomal</i>	43
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXO 1	50
<i>Ajuste de los detectores y amplificadores del voltaje para el citómetro de flujo</i>	50
<i>Valores de compensación para el citómetro de flujo</i>	50
ANEXO 2	51
<i>Análisis de varianza de la cepa W303a a lo largo de la cinética del crecimiento</i>	51
<i>Prueba de T pareada de la cepa W303a a lo largo de la cinética del crecimiento</i>	51
ANEXO 3	52
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA CEPA JF337 A LO LARGO DE LA CINÉTICA DEL CRECIMIENTO.....	52
ANEXO 4	53
<i>Análisis de varianza de la cepa W303a en una curva de arresto con hormona de apareamiento</i>	53
ANEXO 5	53
<i>Análisis de varianza de la cepa JF337 en una curva de arresto con hormona de apareamiento</i>	53
ANEXO 6	54
<i>Análisis estadístico de la frecuencia de reversión en medio YPDA y medio mínimo</i>	54

INTRODUCCIÓN

La división celular es el medio fundamental a través del cual todos los organismos se propagan. En especies unicelulares, como las bacterias y las levaduras, cada división de la célula produce un nuevo organismo, mientras que las especies pluricelulares requieren muchas divisiones secuenciales para crear un nuevo individuo. La división celular también es necesaria para reemplazar las células perdidas por el desgaste, el deterioro o la muerte celular programada en los organismos pluricelulares (Alberts *et al.*, 1996).

La célula depende tanto de los estímulos externos como los internos para que la división celular produzca una progenie viable. Dentro de los estímulos externos se encuentra la disponibilidad de nutrientes y la existencia de algún tipo de estrés como calor, sequía o frío que puedan afectar este proceso. Mientras que a nivel interno, se requiere determinar si posee la suficiente masa celular para soportar una división celular y coordinar todos los eventos realizados durante este proceso, como la duplicación y la división del material genético.

Para la regulación interna requiere de un sistema de control del ciclo celular que lo coordina en su totalidad. Este sistema es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente y está compuesto por un conjunto de proteínas interactivas, proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y ciclinas, las cuales inducen y coordinan los procesos subordinados básicos para llevar a cabo la duplicación y la división del contenido celular, a través de la fosforilación de proteínas clave que participan en cada uno de los eventos a lo largo del ciclo celular (Alberts *et al.*, 1996).

Este sistema de control a su vez interactúa con otras vías de transducción de señales como la vía TOR (Rohde *et al.*, 2001) y la vía Ras-cAMP (monofosfato de adenosina cíclico). La vía Ras-cAMP está involucrada en el control de la proliferación particularmente basada en la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y la resistencia al estrés (Thevelein *et al.*, 1999).

Como parte de la vía Ras-cAMP se encuentra la proteína Cdc25 (*cell division cycle, cdc*) que es un intercambiador de nucleótidos GDP – GTP de Ras (Broek *et al.*, 1987; Lai *et al.*,

1993). La proteína Cdc25 es requerida para la producción de cAMP y la regulación de los niveles de esta molécula bajo el efecto de las concentraciones de glucosa, principalmente a través de la región carboxilo terminal. (Van Aelst *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1993).

En esta investigación se analizará el ciclo celular de una nueva mutante del gen *CDC25* la cual se caracteriza por tener un crecimiento lento y una alta termotolerancia en comparación con la cepa silvestre. El estudio del ciclo celular se realizará a nivel del ciclo de gemación o de la duplicación del material genético para determinar si existe una alteración en el ciclo celular de la mutante que le confiera su fenotipo de crecimiento lento.

El ciclo celular

Generalidades

El ciclo celular se define como el período entre dos divisiones mitóticas. La fracción de tiempo que transcurre a partir del final de una mitosis hasta el inicio de la próxima se denomina interfase, la cual se divide en tres períodos: G1, S, y G2 (Lewin, 1997).

Durante la mitosis (M), la etapa más corta del ciclo celular, tanto el núcleo como los cromosomas se dividen y se distribuyen en las células hijas. El efecto neto de la mitosis es que cada cromosoma forma una copia de sí mismo y luego, esta estructura doble se divide para dar lugar a la formación de dos cromosomas hijos, cada uno de los cuales se dirige a un núcleo descendiente distinto (Mathews *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 1998).

Durante la fase G1, la célula lleva a cabo el proceso de replicación una vez que sobrepasa el punto de restricción (R), o punto de inicio (Alberts *et al.*, 1996). Después de este punto los acontecimientos programados son irreversibles. Durante esta fase se sintetizan muchos de los factores, proteínas y ARN necesarios para la replicación (Griffiths *et al.*, 1998). En la fase S se duplica el genoma. Para ello es necesaria la replicación previa de una estructura en la envoltura nuclear, conocida en levaduras como cuerpo polar del huso y en células animales como centriolo, que actúa como parte de un importante centro organizador de los microtúbulos que durante la interfase está estrechamente asociado con el núcleo (Alberts *et al.*, 1996). Al final de la interfase se promueve la fase intermedia G2, durante la cual la célula se

prepara para la entrada a la mitosis, entonces los cromosomas se condensan y se sintetizan factores citoplasmáticos importantes para la mitosis (Griffiths *et al.*, 1998).

La falta de nutrientes impide que las células entren en un ciclo de división. A esta etapa no cíclica se le denomina fase G0 o fase de quiescencia (Griffiths *et al.*, 1998). Esta fase es semejante a G1; no obstante, las células son incapaces de continuar hacia la fase S. Existen algunas células que pueden ser estimuladas para abandonar esta etapa y entrar nuevamente al ciclo celular en un período antes del punto de restricción de la fase G1 (Lewin, 1997).

Para asegurar que cada fase finalice correctamente antes de iniciar la siguiente, existen varios puntos de regulación a lo largo del ciclo celular, cada punto de regulación representa un circuito de control que marca el inicio de un evento en el ciclo celular dependiente del evento anterior (Lewin, 1997).

Puntos de regulación o verificación en el ciclo celular

En el caso de las células animales, el punto más importante de regulación es la etapa G1 mientras que G2 / M se considera como el punto de control subsidiario. En este tipo de células, la mayor parte de un ciclo celular abarca la fase G1 y la duración de este período responde a las condiciones de crecimiento. En contraste, los organismos haploides pueden usar G1 o G2 como el punto de control primario. En el caso de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, el punto de regulación más importante es G2 mientras que para *S. cerevisiae* es G1 (Murray *et al.*, 1993).

En general, en todos los organismos eucariotes, los puntos críticos de regulación o verificación del ciclo celular son tres: el control en G1, el comienzo de la fase S y la entrada a la mitosis. El control en G1, específicamente en el punto de restricción o de inicio, la célula sigue el proceso de división o no dependiendo de varios parámetros como la respuesta a estímulos externos, incluyendo la concentración de nutrientes y la cantidad de la masa celular existente, entre otros. Cabe señalar que la masa celular debe duplicarse de tal manera que la célula posea el material suficiente para aportar a las células hijas antes de iniciar un nuevo ciclo de replicación. El segundo punto de verificación es durante el inicio de la fase S, debido a que, durante este lapso, el aparato de replicación inicia la síntesis de DNA. Una célula debe

llevar a cabo el proceso de replicación del material genético una sola vez durante cada ciclo y evitar la división celular hasta que haya completado el proceso de replicación (Lewin, 1997).

El tercer punto ocurre al inicio de la mitosis que es identificado por el momento en el cual la célula inicia su reorganización para llevar a cabo la división. Muchos de los puntos de verificación operan en la mitosis para asegurar que cada célula no se divida a menos que se hallan completado todos los eventos necesarios que anteceden a este proceso (Lewin, 1997).

El control básico que permite una separación temporal entre la fase S (replicación del DNA) y la mitosis (segregación de los cromosomas), parece estar conservado en todos los eucariotes y depende de la formación de los complejos ciclina-cinasa de proteínas que regulan la transición entre la fase S y la mitosis. Este mecanismo provee de varios niveles de regulación de los componentes del ciclo celular y su actividad. Además este dispositivo se ha diversificado en diferentes grupos de eucariotes para alcanzar las respuestas apropiadas de la división celular a señales intrínsecas y extrínsecas respecto a las células (Murray *et al.*, 1993).

La cinasa de proteínas involucrada durante la mitosis es designada como cinasa de la fase M, factor promotor de la maduración (MPF) o *cdc2 / CDC28*. Esta cinasa de proteínas se activa a al unirse con la ciclina correspondiente y transfiere grupos fosfato, a partir de ATP, a aminoácidos definidos en las proteínas blanco (Murray *et al.*, 1993). La ciclina asociada a la cinasas de proteínas de la fase M consiste en una proteína sintetizada periódicamente a lo largo del ciclo celular y su degradación provoca la liberación de las células hijas para dejar la mitosis (Lewin, 1997).

El complejo dimérico, *Cdc2p / Cdc28* y una ciclina, puede fosforilar una gran cantidad de sustratos proteicos en aminoácidos específicos, la única característica común en los sustratos que son fosforilados por la cinasa es la presencia de los residuos de aminoácidos serina - prolina flanqueados por residuos de aminoácidos básicos. Los sustratos hallados *in vitro* incluyen a la histona H1 (auxiliar de la condensación de los cromosomas), laminas (posiblemente requeridas para la ruptura de la envoltura nuclear), nucleolinas (involucradas potencialmente en el arresto de la síntesis de ribosomas) y otras actividades estructurales y enzimáticas (Lewin, 1997).

La conservación de la estructura de Cdc2 / Cdc28 entre células animales y levaduras y la participación de dímeros relacionados que regulan el punto de inicio en ambos tipos de levadura, *S. pombe* y *S. cerevisiae*, sugiere la presencia de un esquema similar en las células animales. La diferencia más importante en las células animales, es la presencia de una variación mayor en las subunidades de las cinasas. En combinación con la misma subunidad catalítica en ambas fases de regulación, el punto de inicio y la transición G2 / M, las células presentan un gran número de ciclinas. Durante G1, las células animales tienen múltiples cinasas involucradas en el control del ciclo celular y estas varían tanto en la subunidad catalítica como en la subunidad regulatoria. En contraste, las levaduras solamente presentan una sustitución de la subunidad regulatoria. Otra diferencia notoria entre células animales y las levaduras es la presencia de una variación en los aminoácidos de la cinasa M involucrados para su activación. Por ejemplo, en células animales se requieren 3 aminoácidos para su activación (treonina-14, tirosina-15, treonina-167) mientras que en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, se necesitan 2 aminoácidos: tirosina y treonina (Lewin, 1997).

Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Características generales

Saccharomyces cerevisiae o levadura del pan es un organismo eucariote unicelular con un ciclo celular somático. Es un organismo con muchas ventajas para el estudio del ciclo celular, ya que crece rápidamente en un medio simple que contenga glucosa y aminoácidos. Además su división por gemación facilita el rastreo del avance del ciclo celular en organismos vivos (Murray *et al.*, 1993).

Al analizar la cinética del crecimiento de una población de la levadura del pan, dentro de un cultivo discontinuo (en el cual todos los nutrientes se añaden desde un principio), se hacen evidentes 5 fases: la fase lag o de retraso inicial seguida por una de crecimiento exponencial o logarítmica. A continuación se presenta el cambio diáuxico, una fase de desaceleración del crecimiento que se mantiene durante la fase postdiáuxica y finalmente el crecimiento se detiene al llegar a la fase estacionaria (Deacon, 1988; Wemer-Washburne *et al.*, 1993).

S. cerevisiae es una célula haploide y unicelular, que puede funcionar como un gameto. Esta levadura presenta dos tipos sexuales, designados como "a" y "α", los cuales pueden ser considerados análogos a masculino y femenino. Estos tipos sexuales solo se distinguen entre sí cuando se aparean ya que estructuralmente son muy similares. Las células al aparearse, excretan hormonas peptídicas (feromonas) que reciben el nombre de factor a y factor α. Estas hormonas se fijan a las células de tipo sexual opuesto y generan respuestas metabólicas a través de la vía de transducción de señales MAPK y de la transducción genética que dan lugar a cambios en su superficie celular, para que las células se asocien y se fusionen dando lugar a un organismo diploide (Brock *et al.*, 1993). Las respuestas celulares generadas por estas feromonas incluyen: un crecimiento polarizado hacia la pareja de apareamiento, el arresto del ciclo celular en G1 y el incremento de la expresión de las proteínas necesarias para la adhesión, la fusión celular y nuclear (Gustin *et al.*, 1998). A baja concentración de nitrógeno la célula diploide sufre un proceso de esporulación o meiosis y forma 4 nuevas células haploides, las cuales, a su vez, siguen un ciclo celular mitótico formando una gema o célula descendiente de tamaño menor que la célula original o madre. (Murray *et al.*, 1993). La formación de una nueva gema ocurre durante la transición G1 / S, después del punto de restricción (Gustin *et al.*, 1998) lo cual permite a la célula tener el tamaño adecuado para llevar a cabo la división celular.

Regulación del ciclo celular

Cabe señalar que el punto R (punto de inicio) es una de las etapas regulatorias de transición más destacado en la fase temprana de la fase G1. Antes de este punto, las células tienen varias opciones de desarrollo dependiendo de su ambiente externo. Las células bien alimentadas prosiguen con el ciclo celular mientras que las células limitadas en nutrientes pueden entrar a un estado de quiescencia (fase G0) o comenzar la esporulación en caso de ser diploides, y las células expuestas a la feromona de apareamiento se arrestan en G1 e inician el programa de entrecruzamiento. En contraste, las células que se encuentran en una etapa tardía de G1, después del punto de inicio, o en etapas subsiguientes, generalmente proceden a completar el ciclo celular inclusive si son privadas de nutrientes o son expuestas a las feromonas de apareamiento. Estas observaciones indican la existencia de un punto de decisión en G1 (el punto de restricción o de inicio), en el cual las células se comprometen con un programa particular de desarrollo. En *S. cerevisiae*, la progresión a través del punto R desencadena múltiples eventos del ciclo celular, incluyendo la iniciación de la replicación del

DNA simultáneamente con la formación de la gema y la duplicación del centro organizador de microtúbulos (Lew *et al.*, 1997). Estos procesos requieren de la actividad de la cinasa Cdc28 que forma un complejo con las ciclinas G1 codificadas por los genes *CLN1*, *CLN2* y *CLN3*. (Gustin *et al.*, 1998).

Los análisis de las mutantes del gen *CDC28* en la levadura del pan muestran que hay más de un tipo de ciclo involucrado en el ciclo celular, los cuales están conectados en puntos cruciales. Estos períodos son: el ciclo cromosomal, el citoplasmático y el centrosómico. El período cromosomal comprende los eventos requeridos para duplicar y separar los cromosomas, como la iniciación, continuación y cumplimiento de la fase S y la división nuclear. El ciclo citoplasmático consiste en la formación de la gema. El tercer ciclo, el ciclo centrosómico, son los eventos asociados con la duplicación y la separación del cuerpo polar del huso (SPB) el cual sustituye al centrosoma y organiza los microtúbulos que permiten la segregación cromosomal dentro del núcleo (Lewin, 1997). Con base a los eventos anteriores, se considera que G1 / S es una transición notable en este organismo, en contraste con *S. pombe* organismo en el cual es más importante la transición G2 / M (Lew *et al.*, 1997).

La definición de la transición G2 / M en *S. cerevisiae* ha sido más confusa y controversial ya que muchos eventos distintivos de la mitosis están ausentes o son difíciles de monitorear en levaduras. En general, se ha considerado a la anafase, que implica la elongación del huso y la segregación de los cromosomas, como un punto de reconocimiento de la fase M. No obstante en *S. cerevisiae* muchos puntos de reconocimiento identificados de la mitosis están ausentes o son difíciles de monitorear en las levaduras. Por ejemplo, la membrana nuclear no se rompe, la condensación de los cromosomas ocurre pero su pequeño tamaño de éstos dificulta su detección y muchos de los compartimentos membranales son transportados hacia la gema a través de la fase de gemación, por lo que la formación de vesículas de compuestos membranales asociada a la mitosis no es necesaria para su segregación. Como resultado ha sido propuesto el ensamblaje del huso como la única marca citológica disponible para la entrada de la fase M. Estas características y el hecho de que el ensamblaje del huso generalmente ocurre antes de iniciar la anafase, han dejado el concepto erróneo de que la fase S se superpone con la fase M, sin pasar por la fase G2. Sin embargo, ciertos análisis de monitoreo directo de la replicación y la formación del huso han demostrado la existencia de la fase G2 en *S. cerevisiae*

aún cuando el ensamblaje del uso es aceptado como marca del inicio de la fase M (Lew *et al.*, 1997).

Algunos investigadores han preferido simplemente evitar una definición específica y se refieren al intervalo entre el final de la fase S y el inicio de la anafase como la fase G2 / M. En cualquier caso, los principios fundamentales del control del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae* no difieren marcadamente de los hallados en otros eucariontes y es posible definir las cuatro fases del ciclo celular: G1, S, G2 y M con base a los intervalos discretos ocupados por la replicación del DNA y los eventos asociados con la segregación de los cromosomas (Lew *et al.*, 1997).

En la fase G1 del ciclo celular de la levadura del pan, dentro del punto de inicio, se ha observado que las células arrestadas con factor α se ubican en un punto temporal diferente que las células en inanición. Para el sitio de arresto por inanición se requiere del funcionamiento de la vía Ras - cAMP (Thevelein, 1992).

Vía Ras - cAMP

Componentes de la vía Ras - cAMP

En *S. cerevisiae*, la vía Ras - cAMP está compuesta de varios elementos que interactúan para regular la actividad de la cinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico [PKA] (Werner-Washburne *et al.*, 1993; Thevelein *et al.*, 1999; Thevelein *et al.*, 2000). Esta vía es activada por el producto del gen *CDC25* (Broek *et al.*, 1987; Lai *et al.*, 1993) el cual es un intercambiador de nucleótidos, GDP a GTP, que activa a la proteína Ras, la cual es codificada por los genes *RAS1* y *RAS2*. La proteína Ras también puede activarse por el sistema receptor acoplado a la proteína G, Gpr1 - Gpa2 (Thevelein *et al.*, 1999) así como por Svr2 (Fedor-Chaikin *et al.*, 1990).

La regulación río abajo de Ras es dependiente del incremento de su actividad GTPasa intrínseca a través de Ira1 e Ira2. En la vía Ras - cAMP de levaduras la proteína blanco de Ras es la proteína adenilato ciclasa (AC), codificada por el gen *CYR1*, que cataliza un incremento

en la síntesis de AMP cíclico. El aumento de la concentración de AMP cíclico activa a la PKA a través de la inhibición de las dos subunidades reguladoras de esta proteína, codificadas por *BCY*, y de la liberación de las dos subunidades catalíticas codificadas por *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*. La concentración intracelular del AMP cíclico también es regulado por 2 fosfodiesterasas, Pde1 y Pde2 (Ma *et al.*, 1999). Resultados recientes apuntan a que el sistema receptor acoplado a la proteína G es el responsable de la actividad de la AC en respuesta a la glucosa, mientras que la proteína Ras podría ser causante de la transmisión de señales en condiciones de estrés (Estruch., 2000).

La vía Ras – AMP cíclico en la levadura del pan juega un papel muy importante en el control del metabolismo, la proliferación particularmente en base a la disponibilidad de nutrientes y la resistencia a estrés (Thevelein *et al.*, 1999).

Regulación de la respuesta al estrés

Las respuestas a estrés son particularmente importantes para la levadura del pan y otros microorganismos ya que se encuentran expuestos a condiciones ambientales muy variables, como la temperatura, cambios de la osmolaridad y la disponibilidad de nutrientes (Estruch, 2000).

En *S. cerevisiae*, la vía Ras – cAMP juega un papel muy importante en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Thevelein *et al.*, 1999). Esto se ha confirmado a través del descubrimiento de muchos genes que son inducidos por estrés y regulados negativamente por esta vía de transducción de señales, a través de procesos de fosforilación de algunos componentes del metabolismo de la trehalosa y glucógeno, ya sea en la glucólisis o en la gluconeogénesis (Estruch., 2000).

Existen dos tipos de promotores regulados negativamente por la vía Ras – cAMP que median la activación genética por calor y otras condiciones de estrés: los elementos de choque térmico (HSE) y los elementos de la respuesta a estrés (STRE). Los elementos HSE median la activación transcripcional a través de los factores de choque térmico (Hsf), principalmente en respuesta a un choque térmico (aumento súbito de temperatura). Mientras que los elementos de STRE median la expresión genética en respuesta a una variedad de factores de estrés tales

como la ausencia de nitrógeno, el estrés osmótico y oxidativo, el estrés por un bajo pH externo, la presencia de ácidos orgánicos débiles, etanol y calor (Estruch, 2000).

Otros blancos de la vía Ras – cAMP son los factores de transcripción Msn2 y Msn4, que median parte de la inducción de los genes de estrés controlados por los elementos de STRE y posiblemente son regulados negativamente por esta ruta metabólica (Thevelein *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la PKA podría actuar a través de la inducción de la exportación de Msn2 y Msn4 por Msn5 que actúa como un modulador de la actividad de estos factores. Este papel podría estar más relacionado con el nivel de respuesta a las condiciones de crecimiento celular que con la traducción de señales de estrés (Estruch, 2000).

Se ha sugerido que la función de la proteína Ras puede estar relacionada con la percepción y la transmisión de las señales de estrés en base a la actividad de Cdc25 (Broek *et al.*, 1987). Esta proteína está regulada positivamente a través de una interacción directa con la proteína citosólica Ssa, un miembro de la familia Hsp70p (Geymonat *et al.*, 1998). Este modelo implica que la acumulación de las proteínas desnaturalizadas bajo condiciones de estrés reduce la actividad de la vía cAMP – PKA por reclutamiento de las proteínas de choque térmico (Hsp) y la reducción de su interacción con Cdc25 menguando su efecto positivo sobre esta proteína (Estruch, 2000). Además, Cdc25 activa a Ras en respuesta a la acidificación intracelular, la cual puede ser inducida por glucosa aunque también puede haber otros motivos (Thevelein, 1992).

Respecto a la regulación por estrés, la vía Ras – cAMP se encarga de la fosforilación, a través de la PKA, de diversas enzimas implicadas en la respuesta a diferentes tipos de estrés. Entre estas enzimas se encuentran las del metabolismo de carbohidratos de reserva, como la trehalasa, glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa (Thevelein *et al.*, 1999), así como muchas proteínas blanco desconocidas. La síntesis de cAMP también es un punto importante de estudio para analizar la respuesta al estrés ya que se ha observado que a niveles bajos de cAMP se incrementa la expresión de las proteínas de choque térmico (Rowley *et al.*, 1993) tales como hsp70, hsp26 y hsp12; y otras proteínas como la ubiquitina, un mediador de la proteólisis (Mager *et al.*, 1993).

La proliferación celular y la resistencia al estrés muestran una relación antagónica en la mayoría de los organismos vivos. Por ejemplo, la levadura del pan presenta una mayor termotolerancia a un choque térmico extremo (50 °C) durante la fase estacionaria, mientras que en la fase logarítmica esta tolerancia es menor. Existe una condición en donde las células en fase logarítmica adquiere termotolerancia¹ si se aclimatan previamente a una temperatura moderada (37°C / 1 hr.) presentándose un fenómeno denominado termotolerancia inducida. Durante esta aclimatación, las células se arrestan en G1 y se expresan los genes de choque térmico. Cabe señalar que la actividad de estos genes, el arresto del ciclo celular así como la tolerancia a estrés son respuestas transitorias. Después de 2 o 3 horas a 37°C, las células silvestres recuperan su capacidad de crecimiento y su termotolerancia basal disminuye significativamente (Walton *et al.*, 1980; Plesset *et al.*, 1987).

Regulación del crecimiento

Respecto a la proliferación celular, los cultivos de *S. cerevisiae* a lo largo de las 5 fases del crecimiento (la fase lag, la fase exponencial, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria) sufren distintos cambios metabólicos y de desarrollo. Estos cambios se inducen para hacer frente a las variaciones de la composición química del medio. Durante la fase lag o de retraso, las células ajustan su metabolismo al nuevo medio y se preparan para la proliferación celular, la cual alcanza su máxima velocidad en la siguiente fase: la fase logarítmica. En este período el sustento es principalmente por fermentación. Además las células son muy sensibles a un choque térmico extremo (50 °C) y otros tipos de estrés, la pared celular es muy susceptible a la degradación con liticasa y no existe una acumulación de carbohidratos de reserva. Cuando los niveles de glucosa disminuyen y el etanol se acumula, las células entran al cambio diáuxico, la velocidad de crecimiento se reduce y su resistencia a estrés se incrementa gradualmente. Debido a la falta de glucosa las células crecen principalmente por respiración, utilizando como fuente de carbono y etanol. Una vez que los nutrientes se agotan, las células entran a una fase estacionaria, cesa el crecimiento y alcanzan su máximo nivel de tolerancia a estrés, su pared comienza a engrosarse y acumulan trehalosa y glucógeno (Wemer-Washburne *et al.*, 1993).

¹ Las levaduras al encontrarse por arriba de la temperatura óptima de crecimiento (temperatura supraóptima) muchas de sus funciones celulares se ven afectadas, pero las células no mueren.

Dependiendo de las distintas condiciones ambientales, las células llevan a cabo un proceso fermentativo o respiratorio. Adicionalmente se encargan de regular su crecimiento así como de incrementar su masa celular a distintas velocidades dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentren. Para mantener un tamaño relativamente constante, tanto en medios fermentativos como respiratorios, las células de levadura deben ajustar su velocidad de progreso a través del ciclo celular, adecuando su tasa de crecimiento para alcanzar un tamaño específico, moviéndose rápidamente a través de G1 en un medio rico, como glucosa, y lentamente en un medio pobre. Por ejemplo, en un medio de glucosa las levaduras crecen más rápido, al menos 3 a 4 veces más, que después del cambio diáuxico (Hall *et al.*, 1998). Cuando la cantidad de glucosa llega a ser una limitante, como durante la fase postdiáuxica en la cual las células respiran, utilizando como fuente al etanol (Werner-Washburne *et al.*, 1993), su crecimiento se torna más lento.

En el control del crecimiento y del ciclo celular, está implicada la vía Ras – AMP cíclico (Werner-Washburne *et al.*, 1993; Thevelein *et al.*, 1999; Thevelein *et al.*, 2000). Esta vía es esencial para el control y la integración de estos procesos, particularmente con respecto al estado nutricional. El mecanismo por el cual la PKA dependiente de cAMP controla el crecimiento es todavía un tema de conjeturas. Sin embargo, recientemente se ha sugerido un mecanismo por el cual las células pueden controlar la proliferación. Este dispositivo está basado en la acción de PKA sobre la traducción de las ciclinas de la fase G1 (Cln1, Cln2 y Cln3) que inducen el paso a través del punto de inicio al unirse con Cdc28 (Pedruzzi *et al.*, 2002; Hubler *et al.*, 1993).

Control del ciclo celular

Se ha sugerido que la formación del complejo Cln3 – Cdc28 regula el paso a través del límite G1/S en el punto de inicio y juega un papel muy importante en la regulación de la transcripción de *CLN1* y *CLN2*, al final de la fase G1. A su vez, la formación de los complejos Cln1 – Cdc28 y Cln2 – Cdc28 posiblemente desencadenan eventos río abajo que permiten a las células proceder a través del punto de inicio. La actividad del complejo Cln3 – Cdc28 es

regulada por la fuente de carbono. Así, su actividad es más alta en glucosa que en una fuente pobre de carbono, como el etanol (Hall *et al.*, 1998).

También se ha encontrado que los niveles de ARN mensajero de *CLN3* son regulados por la fuente de carbono. Además los niveles de la proteína Cln3 son regulados positivamente a nivel post-transcripcional, por la vía Ras – cAMP (Hall *et al.*, 1998).

El cAMP es necesario para la expresión de *CLN1* y *CLN2* y esta condición es inhibida por la eliminación de *CLN3*. Mientras que el cAMP regula los niveles de la proteína Cln3 y la sobre-expresión de *CLN3* es suficiente para evitar los requerimientos esenciales de cAMP (Hall *et al.*, 1998).

Inicialmente se pensó que Cln3 era un blanco directo de la fosforilación realizada por PKA, pero esta idea fue desechada. En cambio, actualmente se sugiere que el cAMP regula la traducción de Cln3 a través de un mecanismo que involucra a algunos elementos encontrados en los extremos del RNA mensajero de *CLN3* (Hall *et al.*, 1998).

ANTECEDENTES

El grupo del Dr. Nieto ha estado interesado en el estudio de la coordinación de la respuesta al estrés por calor, el crecimiento y el desarrollo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para este propósito se obtuvieron un total de 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada, mediante mutagénesis química de la cepa silvestre W303a-LEU⁺ con EMS (etilmetano-sulfonato), de acuerdo al método de Lawrence (Folch-Mallol *et al.*, 2002a), y ciclos de exposición a choques letales de 50 °C.

El análisis genético de estas mutantes mostró la existencia de 6 grupos de complementación que fueron nombrados *hsr* (del término inglés: *heat shock response*) debido a que uno de ellos es alélico a la mutante *hnr1* descrita por Iida y Yahara, en 1984. El análisis de tétradas con un ensayo de termotolerancia cuantitativo, confirmó que las mutaciones son nucleares y monogénicas en la mayoría de los casos estudiados (Folch-Mallol *et al.*, 1999). El

análisis genético de estas mutantes demostró que las mutantes son recesivas para la mayoría de los casos y solamente dos resultaron codominantes (Casas *et al.*, 1996).

Estas mutantes tienen una termotolerancia constitutiva de 10 a varios miles de veces más alta que la cepa silvestre y un tiempo de duplicación mayor que la cepa silvestre. Los resultados obtenidos para la mayoría de las mutantes fueron niveles de termotolerancia muy elevados en todos los períodos de crecimiento, incluso en la fase postdiáuxica. Cuando, en general en estos estadios de crecimiento son muy sensibles a temperaturas letales (Casas-Flores, 1998). En general, las mutantes más termotolerantes presentan tiempos de duplicación más largos que las mutantes de mediana y baja termotolerancia, las cuales tienen tiempos de duplicación próximos al de la cepa silvestre (Casas, 1998).

También presentan un fenotipo de colonia pequeña que cosegrega con la alta termotolerancia intrínseca que poseen. Sin embargo, este fenotipo puede revertir. Estudios preliminares indican que un 2 % de la población revierte, y la mayor parte adquiere un tamaño de colonia similar al de la cepa silvestre. El análisis genético de las revertantes ha demostrado que posiblemente se trata de una supresión extragénica más que de una reversión en el mismo locus. Cuando un supresor de la mutante *SJBT4* fue cruzado con la mutante parental original, la supresión manifestó un fenotipo dominante (tamaño de la colonia y nivel de termotolerancia silvestres); mientras que la progenie segrega en una proporción 2:2, sugiriendo que la alta frecuencia de supresión se debe a un mecanismo mendeliano (Folch-Mallol *et al.*, 1999).

En esta investigación, se analizó la posible existencia de alguna alteración del ciclo celular de la mutante *htr2-1*, actualmente denominada *cdc25-21*, que codifica una proteína Cdc25 truncada, a la cual le faltan 612 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (del aminoácido 978 al 1589), región en la que reside el dominio catalítico (Folch *et al.*, 2002a). A diferencia de las mutantes obtenidas por Van Aelst y colaboradores, en 1990, que no son capaces de vivir en glucosa cuando les falta la parte carboxilo terminal la mutante *cdc25-21* sigue siendo viable en glucosa a pesar de que le falta esta región.

La mutante *cdc25-21* presenta una termotolerancia elevada, una pared celular gruesa y una alta acumulación de glucógeno. En glucosa, tiene una baja velocidad de crecimiento durante la fase exponencial, mientras que su crecimiento en acetato o glicerol como fuentes de C está dañado (Folch-Mallol *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar el análisis del ciclo celular de la mutante *cdc25-21* y hacer una comparación con el ciclo celular de la cepa silvestre para saber si está alterado en la cepa mutante.

Objetivos particulares

1. Llevar a cabo el análisis del ciclo de gemación en la cepa mutante *cdc25-21*, a través de la cuantificación de células gemantes y no gemantes en una población a lo largo de su cinética de crecimiento.
2. Analizar el ciclo cromosomal de la cepa mutante *cdc25-21* a través de la cuantificación del DNA en las células de esta cepa por medio de la citometría de flujo.

HIPÓTESIS

Se plantean dos hipótesis alternativas:

1. La alteración del tiempo de duplicación de la mutante *cdc25-21* se debe a que una fracción elevada de las células del cultivo se encuentran en G0.
2. Todas las células del cultivo se dividen lentamente debido al alargamiento de alguna de las fases del ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

W303a -LEU ⁺ *	<i>Mata ccm1 - 100 ade2-1 bis3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura 3-1 ?::LEU2⁺</i>
JF337 **	<i>Mata ccm1 - 100 ade2-1 bis3-11, 15 leu2-3, 15 trp1-1 ura 3-1, ?::LEU2⁺, ade2S-21</i>
JF335 **	<i>Mata ccm1 - 100 ade2-1 bis3-11, 15 leu2-3, 15 trp1-1 ura 3-1, ?::LEU2⁺, ade2S-21</i>

* Silvestre

** Mutante

Medios de cultivo

Medio YPDA líquido: Se disolvió extracto de levadura (Y) al 1%, bacto-peptona (P) al 2%, glucosa (D) al 0.2% y 4mg/L de adenina (A) en 500ml de agua y se ajustó el volumen a un litro (Guthrie *et al.*, 1991).

Medio mínimo líquido: Se disolvió en agua YNB (Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos al 0.67%), dextrosa al 2%, mas los siguientes requerimientos de auxotrofias: aminoácidos (L-triptofano 2mg/L, L-histidina 20mg/L, L-leucina 3mg/L) y nucleótidos (Sulfato de adenina 40mg/L, uracilo 20 mg/L), posteriormente se ajustó el volumen a un litro (Guthrie *et al.*, 1991).

Medios sólidos: Tanto al medio mínimo como al medio YPDA se les agregó como sustancia solidificante agar bacteriológico Difco al 2% (Guthrie *et al.*, 1991).

Esterilización de medios: Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 110°C durante 20 minutos a 15lb/sq de presión.

Condiciones de crecimiento

Todos los cultivos se mantuvieron a 25°C. En el caso de los medios líquidos, estos se colocaron en agitación a 250 rpm. Para evitar una gran cantidad de revertantes en las muestras

de la mutante *alc25 - 21*, se utilizaron colonias pequeñas como inóculos frescos (de 3 días) considerando que las colonias pequeñas contienen células de crecimiento lento, correspondientes a las células mutantes, mientras que las revertantes muestran un fenotipo de colonia grande similar al de las silvestres.

Para evaluar la existencia de células revertantes en cultivos líquidos, durante el crecimiento de las células en suspensión se calculó su tiempo de duplicación a lo largo de cinéticas de crecimiento. Estos tiempos de duplicación se determinaron a través del uso de la ecuación de ajuste de la curva exponencial reportada por Draper y Smith (Draper *et al.*, 1981).

Con el objeto de asegurarse de la homogeneidad de la población analizada de la mutante *alc25 - 21*, durante el crecimiento de las células en suspensión se calculó su tiempo de duplicación a lo largo de cinéticas de crecimiento. Además después de cada experimento, se tomaron 100µl del cultivo y se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 con agua destilada, de las cuales se plataron 50 µl por duplicado en cajas Petri con medio de cultivo YPDA sólido y se incubaron durante 72 horas. Posteriormente, se realizó la cuantificación de colonias revertantes a través de un contador de colonias manual (Scienceware) mientras que el número total de colonias se analizó con un contador automático (COVASIAM).

Determinación del número de colonias con el contador automático COVASIAM

El COVASIAM consiste en un analizador de imágenes que permite la detección de colonias aprovechando las propiedades ópticas de la superficie de las colonias. Para ello, una lámpara de halógeno ilumina de forma oblicua a la caja Petri con el objeto de producir una imagen brillante del filamento en cada colonia. Esta imagen está compuesta de un punto muy brillante rodeado de contornos mucho menos brillantes, lo cual es captado por una cámara digital mientras que una computadora analiza la imagen y cuantifica el número de colonias mediante un algoritmo que digitaliza la imagen en contornos de acuerdo a una escala de grises (Corkidi *et al.*, 1998). Estos contornos, que semejan un mapa topográfico, son reanalizados para eliminar todo menos las cúspides de las "montañas", de este modo se logra la separación de colonias confluentes. Finalmente el número de colonias se muestran en una hoja de Excel anexada al programa, realizada por el Dr. Corkidi y la Ing. Blanca Itzel Taboada.

Determinación de la frecuencia de reversión

Micromanipulación

Se tomó una pequeña asada de una colonia pequeña y fresca de la mutante JF335 que fue resuspendida en agua destilada (de 300 a 600 μ l), se agitó brevemente con un vortex (Fisher) y posteriormente se colocaron 40 μ l de esta solución a la mitad de una caja petri con medio mínimo o YPDA. Una vez secas las muestras, se separaron células sin gema con la ayuda de una aguja de disección ajustada a un microscopio (Guthrie *et al.*, 1991). Estas células se colocaron en espacios separados localizados en los extremos de la caja, aproximadamente 40 células por caja, para obtener colonias aisladas. Finalmente la caja se mantuvo en incubación a 25°C durante tres días. El mismo procedimiento fue realizado en medio YPDA.

Obtención de colonias, dilución y siembra

A lo largo de 72 horas, en condiciones de asepsia se tomaron tres colonias completas con una navaja estéril cortando el medio circundante a cada una. Las colonias fueron colocadas en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) con 200 μ l de agua destilada estéril. Para medio mínimo, se tomaron muestras a las 30, 42, 48 y 72 horas. Mientras que para medio YPDA se colectaron muestras a las 24, 30, 42, 48, 66 y 72 horas.

De cada muestra, se tomaron 100 μ l para realizar diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 con agua destilada obteniendo un volumen final de 1ml por cada dilución. A partir de estas diluciones se platearon 100 μ l en medio mínimo sólido y se incubaron el tiempo necesario, de 96 a 120 horas.

Cuantificación del porcentaje de reversión

Finalmente, se realizó la cuantificación de las colonias revertantes a través del contador manual mientras que el número total de colonias se determinó con el contador automático COVASIAM.

Para obtener el número de colonias revertantes por mililitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\text{No. de colonias}) (\text{dilución}) (2) (5)$$

Cabe señalar que se multiplicó por dos considerando que se tomó la mitad del volumen de la muestra; posteriormente se multiplicó por 5 para obtener el número de colonias revertantes por mililitro tomando en cuenta que el volumen final de la muestra fue de 200µl.

Mientras que para obtener el porcentaje de reversión se utilizó una segunda fórmula:

No. de colonias revertantes

Total del no. de colonias

Análisis estadístico: Prueba de T

Para determinar si existe una diferencia en el crecimiento en medio mínimo y medio YPDA se realizó una prueba T para muestras independientes, en la cual se analizó cada par de muestras (medio mínimo y YPDA) correspondientes a los siguientes puntos 30 hrs., 42 hrs., 48 hrs. y 72 hrs., que son los puntos en los cuales coinciden la colecta de las muestras de medio mínimo y las ejemplares de YPDA.

Análisis del ciclo citoplasmático

Soluciones

1. **PBS pH 7.4:** Se disolvieron 8 g de cloruro de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio, 1.44 g de Na_2HPO_4 y 24 g de KH_2PO_4 en 800 ml de agua destilada. El pH fue ajustado a 7.4 con HCl para después aforar el volumen a un litro. Esta solución se esterilizó en una autoclave durante 20 minutos a 15lb/sq de presión. (Sambrook *et al.*, 1989)
2. **Formaldehído al 7.4%:** Se colocaron 10 ml de formaldehído al 37% (JT. Baker) en un tubo cónico de propileno estéril (Falcon) de 15ml y se le agregó 40 ml de PBS, pH 7.4.

Estudios de poblaciones asincrónicas a lo largo de una cinética del crecimiento

Las cepas W303a y JF337 fueron inoculadas en matraces erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio mínimo e incubadas a 25 °C durante toda la noche. Al siguiente día, a partir de las 16.5 horas de haberse iniciado el cultivo, se tomaron dos muestras cada hora, durante 9 horas. Posteriormente se dejó en incubación el cultivo y se tomó una alícuota a las 41.5 horas. Con una de las muestras se realizó una dilución 1 / 2 con agua destilada estéril para medir la D.O 600_{nm} y así obtener la curva de crecimiento de los cultivos. Mientras que la otra muestra fue resuspendida en 500 µl de formaldehído al 7.4% (Tida *et al.*, 1984) y se almacenó en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf) a 4°C.

Cuantificación de las células gemantes y no gemantes en la cámara de Neubauer

Una vez fijadas las muestras con formaldehído al 7.4% las células fueron agitadas brevemente con un vortex e inmediatamente se separaron utilizando un sonicador (Branson Sonifier Cell Disruptor 200) de 8 a 10 segundos, en una *unidad de poder 2*. Nuevamente, se agitaron brevemente con un vortex e inmediatamente se tomaron 9 µl de cada muestra que fueron colocados en ambos pozos de una cámara de Neubauer (Marienfeld) para realizar el conteo de células gemantes y no gemantes. Cabe señalar que para obtener un estudio representativo de la población celular, se contaron 300 células por muestra, utilizando el número de cuadros necesarios de la cámara de Neubauer. Las observaciones fueron realizadas a 40X en un microscopio óptico (Axioscop) en campo claro (Márquez-Guzmán ed., 1985)

Para determinar el número de células tanto gemantes como no gemantes en un mililitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\text{No. de células contadas} / \text{No. de cuadros contados}) \times 25 \times 10000 \times 2$$

Considerando que cada pozo de la cámara de Neubauer se encuentra dividido en 25 cuadros de 0.04 mm² de área, lo que es equivalente a 1.0 mm² de área de cada pozo. Si se toma en cuenta que cada pozo tiene 0.1mm de profundidad, entonces el volumen total del pozo es de 1.0 mm² x 0.1 mm = 0.1 mm³ (Márquez-Guzmán ed., 1985). Para expresar la cantidad de células por mililitro se consideró que 1 ml = 1000 mm³ por lo que 0.1 mm³ x

10000 = 1 ml y por último se tomó en cuenta la dilución 1/2 de la muestra en el fijador, por lo que se multiplicó por 2.

Análisis estadístico: Análisis de varianza

Los datos fueron sometidos a un estudio estadístico con el programa STATISTICA. Se realizó un análisis de varianza con el propósito de definir si existía alguna diferencia significativa en la proporción de no gemantes a lo largo de la cinética del crecimiento. Para ello, se planteó como hipótesis nula que todas las muestras son iguales, mientras que en la hipótesis alternativa se propuso lo contrario, las muestras son diferentes. Para aquellos resultados en los cuales se rechazó la hipótesis nula, se llevó a cabo una comparación de medias *post-hoc*, denominada prueba de Tukey HSD, con un intervalo de confianza de 0.01, para conocer cuáles eran las muestras que diferían entre sí. Esta misma prueba se realizó con las células gemantes.

Asimismo, se determinó si existía una diferencia significativa entre la proporción de gemantes y no gemantes en cada punto de la cinética de crecimiento a través una prueba pareada T (Pagano *et al.*, 2001), con un intervalo de confianza de 0.01.

Análisis del ciclo cromosomal

Soluciones

- **Factor α 1 mg / ml:** 1 mg de la hormona de apareamiento (SIGMA) se disolvió en 1 ml de alcohol etílico absoluto anhidro (J.T. Baker) y se almacenó a -20°C .
- **Citrato de Sodio 0.1 M pH 7:** Se disolvieron 2.941 g de citrato de sodio dihidratado granular (J.T. Baker) en agua destilada, posteriormente se ajustó el volumen a 100 ml.
- **Citrato de Sodio 50 mM pH 7:** Se tomaron 50 ml de la solución de citrato de sodio 0.1 M pH7 y se agregaron 50 ml de agua destilada.
- **Cloruro de Sodio 0.1 M:** Primero se hizo una solución concentrada 5 M, para ello se disolvieron 2.922 g de cloruro de sodio en 8 ml de agua destilada. Una vez disuelto, se

ajustó el volumen a 10 ml y se esterilizó en una autoclave. A partir de esta solución concentrada, se tomaron 20 μ l que se disolvieron en 1 ml de agua destilada para obtener una concentración de 0.1 M

- **Azida de Sodio 2 %:** Se disolvieron 0.2 g de azida de sodio (SIGMA) en agua destilada, posteriormente se ajustó el volumen a 10 ml.
- **Yoduro de propidio 1 mg/ml:** Se disolvieron 10 mg de yoduro de propidio en agua, después se agregaron 45 μ l de azida de sodio al 2 % y se ajustó el volumen a un mililitro. A partir de esta solución concentrada se preparó una solución de 1 mg/ml, para ello se colocaron 100 μ l de la solución de yoduro de propidio en un tubo eppendorff de 1.5 ml y se ajustó el volumen a 1 ml con agua tetradestilada y filtrada. Ambas soluciones fueron almacenadas a 4 °C.
- **Tris HCl 10 mM, pH 7:** Se disolvieron 0.012 g de Tris, ultra puro (Research Organics) en agua destilada, se ajustó el pH a 7 con HCl y finalmente se ajustó el volumen a 100 ml.
- **RNAsa pancreática libre de DNAsa 20 μ g/ml:** A partir de una solución concentrada 10 mg/ml se disolvieron 10 μ l en 990 μ l de agua destilada, para obtener una concentración final de 100 μ g/ml, posteriormente se separó en alícuotas de 50 μ l en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) que se dejaron hervir en baño maría durante 30 minutos y se dejaron enfriar para finalmente almacenarlas a -20°C.
- **Solución de tinción:** En tubos cónicos de propileno estériles (Falcon) se mezclaron las siguientes soluciones: 10 ml de citrato de sodio 0.1 M, pH 7, 40 μ l de cloruro de sodio 5M, 20 μ l² de Nonidet P40, 320 μ l de yoduro de propidio 1 mg / ml. Finalmente se ajustó el volumen a 20 mililitros con agua tetradestilada y filtrada.

² Posteriormente esta concentración fue cambiada a 100 μ l

- **Solución de mantenimiento:** Se realizó el mismo procedimiento que en la preparación de la solución de tinción, la única diferencia es que no se le agregó yoduro de propidio.
- **EDTA 10 mM:** Se disolvieron 0.372 g en agua destilada, se ajustó el pH a 8 con perlas de NaOH y se agregó el agua suficiente para obtener un volumen de 100ml. Se esterilizó a 120°C durante 20 minutos a 15lb/sq de presión.

Filtración de las soluciones y los medios

Cabe señalar que para evitar la presencia de partículas que pudieran teñirse con el yoduro de propidio, como se observó en estudios previos, todos los medios líquidos (la solución de tinción y la solución de almacenamiento, así como el citrato de sodio 0.1 M pH7) fueron filtrados al vacío utilizando papel filtro de nitrocelulosa con poros de 0.2 μm . (tipo GS, Millipore)

Establecimiento de cultivos sincrónicos con la hormona de apareamiento

En un análisis previo, se estudiaron varias concentraciones de factor α (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para el arresto de las cepas W303a y JF337. Se observó que había una mayor cantidad de células arrestadas con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de factor α en un menor tiempo. Por lo que en esta investigación se decidió partir de esta concentración de hormona de apareamiento para determinar el tiempo de arresto del mayor número de células de levadura.

A partir de una caja de tres días de incubación se tomaron colonias aisladas de las cepas W303a y JF337 que fueron inoculadas en 200 ml de medio mínimo filtrado y se dejaron creciendo toda la noche. Se tomó el número de colonias necesario para obtener una D.O. $_{600\text{nm}}$ de 0.003 para la cepa W303a y una D.O. $_{600\text{nm}}$ de 0.01 para la cepa JF337. Esta D.O. se obtuvo a partir de los cálculos realizados a través de la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ (concentración inicial X volumen inicial = concentración final X volumen final). Para obtener la concentración inicial se disolvieron las colonias colectadas en agua destilada estéril y se midió la densidad óptica. Una vez que se calculó el volumen final, éste se agregó al medio de cultivo.

Una vez alcanzada la fase logarítmica media, con una D.O. 600 nm de 0.4-0.45, se tomó una muestra de 500 μl que fue fijada en un volumen equivalente de formaldehído al 7.4% en PBS (Iida *et al.*, 1984) como tiempo cero. Inmediatamente, se inocularon de 3 a 5 ml de estos cultivos en tubos de vidrio de 15 ml, a los cuales se les agregó la hormona de apareamiento (5 μl / ml de factor α) en condiciones de esterilidad, se incubaron a 25°C / 250 rpm. Posteriormente, en un ambiente estéril se tomaron alícuotas de 500 μl que fueron fijadas en las condiciones ya mencionadas y en los tiempos que a continuación se indican.

Para la cepa mutante, JF337, fueron: 210, 240, 270 y 300 minutos. Para la cepa silvestre, W303a, fueron: 60, 120, 150, 180, 210, 240, 270 y 300 minutos. Posteriormente se realizó el conteo de células gemantes y no gemantes en la cámara de Neubauer. Estos tiempos se establecieron con base en el tiempo de duplicación de cada cepa.

Como ya se ha descrito, para determinar el tiempo de arresto de la mayor cantidad de células, se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey HSD, con un intervalo de confianza de 0.01, a través del programa STATISTICA.

Fijación de muestras para cuantificar el DNA

Una vez obtenidos los cultivos sincronizados, se fijó una muestra de 500 μl con 1.166 ml de etanol anhidro al 100% (J.T. Baker), sustancia que además se encarga de permeabilizar a las células (Fantes *et al.*, 1993). El cultivo restante se dejó incubando a 25°C en agitación tomando alícuotas a los 90, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210, 225, 240, 270 y 300 minutos para la mutante (JF337) y 90, 120, 135, 150, 165 y 180 minutos para la cepa silvestre (W303a). Una vez fijadas las muestras, se almacenaron a 4°C.

Tinción del DNA

Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga (eppendorf), se quitó el sobrenadante de cada muestra y se les agregaron 500 μl de citrato de sodio 50 mM, pH 7. Este procedimiento de lavado se repitió tres veces, finalmente las muestras fueron resuspendidas en 500 μl de esta solución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A cada muestra, se le agregó 12.5 µl de RNasa y se incubó baño María a 37°C durante 1 hora para eliminar el RNA contenido en las células y así evitar que se tñia esta molécula con el yoduro de propidio. Después de este lapso, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm / 5 min. Se decantó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de Buffer de Tinción con yoduro de propidio el cual se intercala en la doble hélice de DNA. Una vez teñido el DNA de las células, las muestras se almacenaron a 4°C (Morano *et al.*, 1999 [modificado])

Pruebas de disgregación

Para evitar la formación de artefactos en el citómetro de flujo debido a que las células forman pequeñas cadenas o grupos de células que no se separan fácilmente cuando están en la solución de tinción o en la de almacenamiento, se realizaron pruebas en diferentes condiciones para separar a la mayor cantidad de células.

Con este propósito, se prepararon seis muestras de 1ml cada una, de células en fase logarítmica (D.O. $_{600nm}$ 4.0) que contenían aproximadamente 2×10^7 células por mililitro y se colocaron en tubos de 5ml (Culture Tubes 12 x 25mm, VWR Scientific) y se realizaron las siguientes pruebas:

Muestra	Condiciones
A1	500 µl de la solución de almacenamiento con 1µl/ml de Nonidet ³ y se emplearon 8 segundos de sonicación.
A2	500 µl de la solución de almacenamiento con 1µl/ml de Nonidet. Se agregaron 500 µl de EDTA 10mM y se aplicaron 8 segundos de sonicación
A3	500 µl de la solución de almacenamiento con 5µl/ml de Nonidet y se administraron 12 segundos de sonicación
A4	500 µl de la solución de almacenamiento con 5µl/ml de Nonidet. Se agregaron 500 µl de EDTA 10mM y se aplicaron 12 segundos de sonicación
A5	500 µl de la solución de almacenamiento con 5µl/ml de Nonidet y se agregaron 500 µl de EDTA 10mM. Inmediatamente se emplearon 15 segundos de sonicación
A6	500 µl de la solución de almacenamiento con 5µl/ml de Nonidet. Posteriormente se agregaron 500 µl de EDTA 10mM y la muestra fue sometida a 15 segundos de sonicación dejando reposar 15 segundos más, repitiendo esto 3 veces.

³ El Nonidet es un detergente, en este caso es utilizado para separar a las células de levadura.

Las muestras fueron analizadas a través del citómetro de flujo y en el microscopio óptico a 40X en campo claro.

Disgregación de las muestras

Una vez establecido que la muestra A6 presenta la mayor cantidad de células disgregadas, las muestras fueron preparadas conforme a esta condición. Posteriormente, se observó que las lecturas de las muestras en el citómetro de flujo mejoraban notablemente al agregar de 1.5 a 2.5 ml más de EDTA 10 mM; el cual actúa sobre los iones divalentes asociados a las células que causan los agregados celulares (Fantes *et al.*, 1993).

Programas y citómetro de flujo

El programa utilizado para capturar los datos de las muestras fue Cell Quest TM y el citómetro de flujo fue FACScan™, ambos de Becton Dickinson. Mientras que para el análisis y presentación de los datos se utilizó el programa WinMDI de Joseph Trotter. (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Parámetros utilizados en el citómetro de flujo

En este estudio se analizaron 10,000 células por cada muestra y se ajustaron los detectores y amplificadores del voltaje y los valores de compensación (ver tabla 1 y 2 del anexo)

Cabe mencionar que la compensación sirve para remover la fluorescencia que no corresponde al canal de lectura. La fluorescencia del yoduro de propidio es roja y puede emitir otro rango de fluorescencia. Esto puede afectar la medición de la fluorescencia y en consecuencia, la cuantificación de DNA. Para evitar una medición errónea de la fluorescencia se deben ajustar los detectores y amplificadores de voltaje, así como los valores de compensación con el objeto de restarle a la fluorescencia total el rango de fluorescencia diferente al esperado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Determinación de la frecuencia de reversión

Dado que las observaciones preliminares no sistematizadas del laboratorio sugerían una diferencia en la cantidad de revertantes dependiente del medio de cultivo, se decidió analizar este fenómeno en medio mínimo y en medio YPDA. Con el objeto de definir la frecuencia de reversión de forma sistematizada, se utilizaron colonias completas cada una proveniente de una sola célula no gemante de tamaño relativamente pequeño (ver materiales y métodos). Este análisis se realizó con tres repeticiones por cada muestra, resuspendiendo cada colonia en el menor volumen posible de agua destilada (200 μ l). Con el objeto de obtener muestras representativas se plateó el volumen total de cada dilución de cada muestra.

La frecuencia de reversión, tanto en medio mínimo como en medio YPDA, presenta un comportamiento diferente en cada colonia. Por ejemplo, en medio rico se presentan varios eventos de reversión con una frecuencia que fluctúa entre 0 hasta 1.97×10^{-2} (tabla 1). Asimismo en medio mínimo la frecuencia de reversión va de 0 a 7.251×10^{-4} (tabla 2).

Para determinar si existía una diferencia en el crecimiento de la cepa mutante en ambos tipos de medio (YPDA y medio mínimo) que pudiera influir en la velocidad de crecimiento de las revertantes respecto a las células mutantes, se realizó una prueba T para muestras independientes en los siguientes tiempos: 30, 42, 48 y 72 horas. En estos tiempos coinciden las muestras de ambos tipos de medio (ver anexo 2). Los resultados de este análisis estadístico indican que no existe una diferencia significativa en cada par de muestras analizadas. Por lo que se sugiere que el crecimiento en medio sólido, durante los primeros 3 días, es similar tanto en medio YPDA como en medio mínimo. Por ende, el tipo de medio utilizado en este experimento no influye en la frecuencia de reversión.

Sin embargo, se sabe que ambas cepas, W303a y JF337, presentan un crecimiento más lento en medio mínimo que en medio YPDA, tanto en medio sólido como en medio líquido. De hecho el tiempo de duplicación para las cepas mutantes *cdc25-21*, (JF335 y JF337), así como para la cepa silvestre (W303a), en medio mínimo es casi el doble que en medio rico (YPDA), respectivamente. También se ha observado que en medio mínimo la frecuencia de reversión es menor que en medio YPDA. Por lo que se requiere de un estudio más detallado y

con una mayor cantidad de muestras para determinar si existe una diferencia significativa entre los tiempos de crecimiento tanto en medio mínimo como en medio rico. Así como para determinar la frecuencia de reversión en la cepa *cdc25-21*.

Tiempo (horas)	Número de células mutantes UFC / ml	Número de células revertantes UFC / ml	Frecuencia de reversión de colonia chica a grande
24	151	0	0
	85	0	0
	ND	ND	ND
30	152	3	0.019759
	162	0	0
	ND	ND	ND
42	1 815	0	0
	2 480	0	0
	5 480	0	0
48	9 880	100	0.010352
	2 435	0	0
	10 815	0	0
66	57 800	0	0
	158 700	10	0.000063
	68 800	80	0.000875
72	235 700	20	0.00
	280 800	0	0.00
	458 500	80	0.000085

Tabla 1. Cinética de crecimiento en medio YPDA en la cual se muestran las tres repeticiones de cada muestra, cada una con las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de las mutantes, así como de las revertantes correspondientes y la frecuencia de reversión de colonia chica a grande de cada repetición. ND = repeticiones no determinadas debido a que estaban contaminadas.

Tiempo (horas)	Número de células mutantes UFC / ml	Número de células revertantes UFC / ml	Frecuencia de reversión de colonia chica a grande
30	ND	ND	ND
	8 775	0	0.00
	50	0	0.00
42	1 200	0	0.00
	980	0	0.00
	ND	ND	ND
48	5 840	0	0.00
	23 700	10	0.000422
	7 955	0	0.00
72	227 500	165	0.000725
	159 900	0	0.00
	225 500	0	0.00

Tabla 2. Cinética de crecimiento en medio mínimo en la cual se muestran las tres repeticiones de cada muestra, cada una con las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de las mutantes, así como de las revertantes correspondientes y la frecuencia de reversión del fenotipo de colonia chica a grande de cada repetición. ND = repeticiones no determinadas debido a que estaban contaminadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis del ciclo celular

Con la finalidad de determinar las posibles alteraciones en el ciclo celular de la cepa mutante *alc25-21* que le confieren el fenotipo de crecimiento lento, se analizó el ciclo celular de esta cepa a nivel del ciclo citoplasmático y del ciclo cromosomal.

Análisis del ciclo citoplasmático

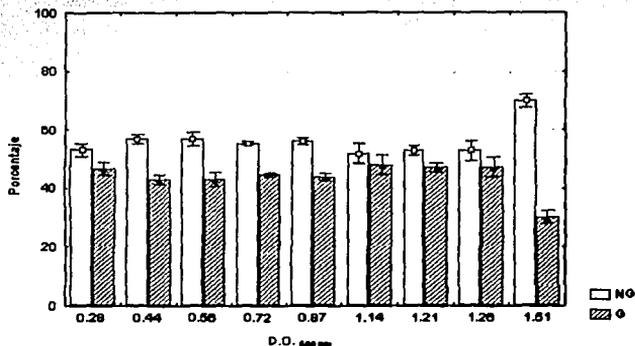
Para estudiar el ciclo citoplasmático que involucra la formación de la gema se compararon los porcentajes de células gemantes y no gemantes con los de la cepa silvestre W303a. Se utilizaron cultivos líquidos iniciados a una D.O._{600 nm} de 0.04 que se incubaron a 25 °C, durante 41.5 horas hasta la fase postdiáuxica. Posteriormente se comparó el proceso de gemación de ambas cepas a lo largo de la cinética del crecimiento a través de un análisis estadístico.

Para saber si existía alguna alteración en la proporción de no gemantes a lo largo de la curva de crecimiento se comparó la proporción de células no gemantes en cada punto de la curva de crecimiento de cada cepa.

Para saber si la proporción de células no gemantes y gemantes difieren significativamente entre sí en cada muestra, se realizó la comparación de la proporción de ambos grupos celulares en cada punto de la curva de crecimiento de las cepas: W303a y JF337.

Los resultados para la cepa silvestre indican que la proporción de células no gemantes a lo largo de la curva del crecimiento osciló alrededor del 50%, excepto en el último punto, con una D.O._{600 nm} de 1.51. En este último punto, correspondiente a la fase postdiáuxica, se incrementó la cantidad de células sin gema hasta alcanzar el 70% (ver gráfica 1 y tabla 3). Asimismo, la cantidad de células con gema fue semejante en cada muestra (aproximadamente el 50%), exceptuado en la fase postdiáuxica, en la que la cantidad de células gemantes constituyó el 30% de la población para esta etapa. Los resultados se obtuvieron a través de un análisis de varianza de una vía y una comparación de medias *post hoc*, denominada prueba de Tukey HSD (ver anexo 2).

El análisis de varianza solamente indica si existe una diferencia significativa o no entre las muestras, sin señalar cuáles son las muestras que difieren. En cambio la prueba de Tukey HSD compara cada muestra con las muestras restantes y determina si existe una diferencia entre cada par de muestras comparadas, mostrando cuáles son las muestras que difieren entre sí.

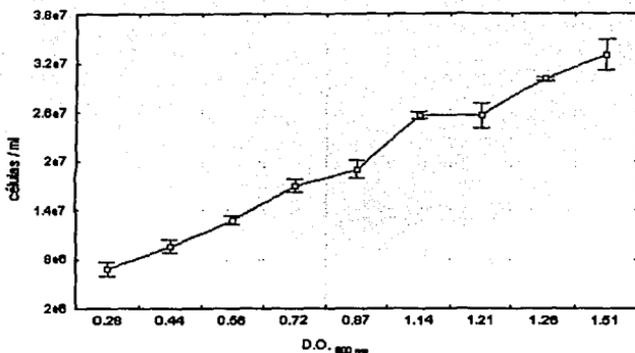


Gráfica 1. Porcentaje de células no germinantes (NG) y germinantes (G) a lo largo de una cinética de crecimiento de la cepa silvestre, W303a. Cada muestra representa el promedio de 3 eventos independientes. Los valores en células por mililitro se pueden observar en la tabla 2.

D.O. 600 nm	células / ml		Porcentajes	
	NG	G	NG	G
0.28	$3.61 \times 10^8 \pm 5.64 \times 10^8$	$3.16 \times 10^8 \pm 3.16 \times 10^8$	53 ± 6	47 ± 5
0.44	$5.46 \times 10^8 \pm 5.21 \times 10^8$	$4.12 \times 10^8 \pm 3.67 \times 10^8$	57 ± 5	43 ± 4
0.56	$7.26 \times 10^8 \pm 4.00 \times 10^8$	$5.49 \times 10^8 \pm 5.16 \times 10^8$	57 ± 0	43 ± 4
0.72	$9.39 \times 10^8 \pm 3.86 \times 10^8$	$7.54 \times 10^8 \pm 4.12 \times 10^8$	56 ± 2	45 ± 2
0.87	$1.06 \times 10^9 \pm 7.84 \times 10^8$	$8.32 \times 10^8 \pm 3.54 \times 10^8$	56 ± 4	44 ± 2
1.14	$1.33 \times 10^9 \pm 1.08 \times 10^9$	$1.23 \times 10^9 \pm 6.01 \times 10^8$	52 ± 4	48 ± 2
1.21	$1.35 \times 10^9 \pm 5.94 \times 10^8$	$1.20 \times 10^9 \pm 9.89 \times 10^8$	53 ± 2	47 ± 4
1.26	$1.59 \times 10^9 \pm 8.91 \times 10^8$	$1.42 \times 10^9 \pm 1.09 \times 10^9$	53 ± 3	47 ± 4
1.51	$2.30 \times 10^9 \pm 1.80 \times 10^9$	$9.94 \times 10^8 \pm 7.28 \times 10^8$	70 ± 5	30 ± 2

Tabla 3. Cantidad de células por mililitro de no germinantes (NG) y germinantes (G) así como los porcentajes correspondientes de la cepa silvestre, W303a. Todos los valores incluyen la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



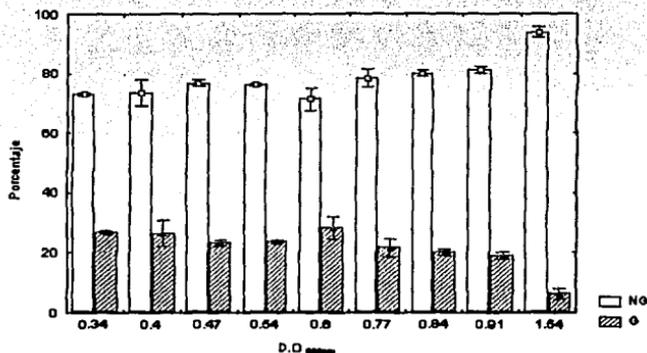
Gráfica 2. Curva de crecimiento de la cepa W303a. En esta gráfica se muestra la cantidad de células totales por mililitro en las horas especificadas. Tiempo de duplicación: 2.18 hrs

A través de una prueba de *T* se compararon las proporciones de células no gemantes y gemantes de cada punto de la cinética de crecimiento para determinar si existía una diferencia entre ambos tipos celulares (ver anexo 2). A través de este análisis estadístico se demostró que solamente existe una diferencia significativa entre la proporción de células gemantes y no gemantes en dos puntos de la curva de crecimiento: en la muestra con una D.O. 600 nm de 0.72 y durante la fase postdiáuxica (D.O. 600 nm 1.51). Los resultados indican que, en general las proporciones de células gemantes y no gemantes son similares durante la fase exponencial.

El estudio de la cinética de crecimiento de la cepa mutante JF337 mostró claramente que a lo largo de toda la curva de crecimiento la población de células no gemantes fue mayor que la población con gema (ver gráfica 3 y tabla 4). Estos resultados se confirmaron a través de una prueba pareada *T* (ver anexo 3).

Al comparar la proporción de células sin gema de todas las muestras a lo largo de la curva de crecimiento, a través del análisis de la prueba de Tukey HSD, se determinó que no existe una diferencia significativa en la proporción de células no gemantes durante la fase exponencial, la cual osciló alrededor del 70 % de la población. Durante la fase postdiáuxica, esta proporción incrementa significativamente hasta el 90%. De forma análoga, la

proporción de células gemantes se mantuvo alrededor del 20% a lo largo de la curva de crecimiento, excepto en la fase postdiáuxica en la cual disminuyó al 10 % de la población.

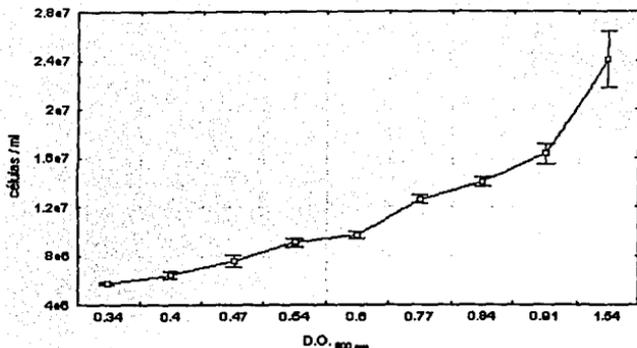


Gráfica 3. Porcentaje de células no gemantes (NG) y gemantes (G) a lo largo de una cinética de crecimiento de la cepa mutante JF337. Cada muestra representa el promedio de 3 eventos independientes. Los valores en células por mililitro pueden observarse en la tabla 3.

D.O. nm	células / ml		Porcentajes	
	NG	G	NG	G
0.34	$4.19 \times 10^8 \pm 3.61 \times 10^8$	$1.54 \times 10^8 \pm 5.03 \times 10^7$	73 \pm 1	27 \pm 1
0.4	$4.73 \times 10^8 \pm 3.40 \times 10^8$	$1.71 \times 10^8 \pm 2.77 \times 10^7$	73 \pm 5	27 \pm 4
0.47	$5.84 \times 10^8 \pm 4.04 \times 10^8$	$1.76 \times 10^8 \pm 8.72 \times 10^7$	77 \pm 5	23 \pm 1
0.54	$6.93 \times 10^8 \pm 2.70 \times 10^8$	$2.14 \times 10^8 \pm 5.29 \times 10^7$	76 \pm 3	24 \pm 1
0.6	$6.95 \times 10^8 \pm 5.25 \times 10^8$	$2.76 \times 10^8 \pm 3.18 \times 10^7$	72 \pm 5	28 \pm 3
0.77	$9.88 \times 10^8 \pm 6.25 \times 10^8$	$2.72 \times 10^8 \pm 3.01 \times 10^7$	78 \pm 5	22 \pm 2
0.84	$1.12 \times 10^9 \pm 4.16 \times 10^8$	$2.80 \times 10^8 \pm 1.00 \times 10^8$	80 \pm 3	20 \pm 1
0.91	$1.32 \times 10^9 \pm 6.35 \times 10^8$	$3.08 \times 10^8 \pm 2.75 \times 10^7$	81 \pm 4	19 \pm 2
1.54	$2.26 \times 10^9 \pm 1.84 \times 10^8$	$1.50 \times 10^8 \pm 5.83 \times 10^7$	94 \pm 8	6 \pm 2

Tabla 4. Cantidad de células por mililitro de no gemantes (NG) y gemantes (G) así como los porcentajes correspondientes de la cepa mutante JF337. Todos los valores incluyen la desviación estándar.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 5. Cinética de crecimiento de la cepa JF337. En esta gráfica se muestra la cantidad de células totales por mililitro en las horas especificadas. Tiempo de duplicación: 3.5 hrs

Estos resultados indican que el ciclo celular de la cepa mutante JF337 está alterado, lo que explica su lento crecimiento (Ver gráficas 2 y 5). Considerando que la formación de la gema ocurre justo después del punto de inicio (Murray *et al.*, 1993), durante la fase G1 y que la cepa mutante presenta características propias de la fase estacionaria: una alta termotolerancia, la presencia de una pared celular gruesa y una alta acumulación de glucógeno (Folch-Mallol *et al.*, 1999) se plantearon dos modelos. El primero sostiene que la mayor parte de las células se arresan en G0 y solamente una pequeña cantidad de células se divide, permitiendo que las células posean un lento crecimiento y las características de fase estacionaria ya mencionadas. El segundo modelo plantea que todas las células tienen una fase G1 más prolongada, durante la cual las células muestran algunas características similares a las de las células en fase estacionaria. Para dilucidar cuál de los dos modelos es correcto se llevó a cabo un estudio del ciclo cromosomal.

Análisis del ciclo cromosomal

El estudio del ciclo cromosomal puede facilitarse si las células tienen un ciclo celular sincronizado (Murray *et al.*, 1993). Con esta finalidad se decidió utilizar la hormona de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

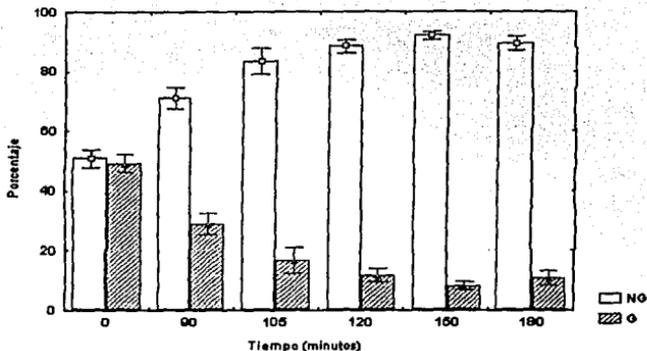
apareamiento, factor α , para arrestar a las células de la cepa mutante *alc25 - 21* (JF337) en una etapa temprana de la fase G1.

Determinación del tiempo de arresto de los cultivos con factor α

Para definir el tiempo de arresto se tomaron alícuotas a partir de cultivos en fase logarítmica, D. O. 600 nm 4.0 - 4.5, que fueron arrestadas con 5 μg / ml de factor α . Posteriormente las muestras fueron fijadas y se determinó la cantidad de células con gema y sin gema en la cámara de Neubauer (ver materiales y métodos).

A los 150 minutos de haber agregado la hormona de apareamiento a en la cepa silvestre W303a hay una mayor cantidad de células arrestadas en G1, aproximadamente el 92% (ver gráfica 6 y tabla 5). El análisis de varianza, con un intervalo de confianza del 0.01 (ver anexo 4), indicó que la proporción de no gemantes a los 150 minutos y a los 120 minutos es diferente. En cambio, al comparar la muestra de 150 minutos con la muestra de 180 minutos se observó que a pesar del rápido incremento en la cantidad de células gemantes, del 3% al 12 %, este aumento no es significativo. Con base a estos resultados se definió que el mejor tiempo de arresto para la cepa silvestre con 5 μl / ml de factor α es de 150 minutos.

En la cepa mutante JF337 la cantidad de células no gemantes aumentó rápidamente cuando se agregó la feromona de apareamiento (ver gráfica 7 y tabla 6). Sin embargo, la mayor proporción de células no gemantes, el 98%, se obtuvo hasta los 240 minutos de haber agregado la hormona de apareamiento. Cabe mencionar que el análisis de varianza indicó una diferencia significativa en la cantidad de no gemantes entre los 210 y los 240 minutos. En cambio, entre los 240 minutos y los 270 minutos, la disminución de no gemantes no fue significativa (ver anexo 5). Con base a estos resultados, se determinó que el mejor tiempo de arresto para la cepa la cepa mutante es de 240 minutos.

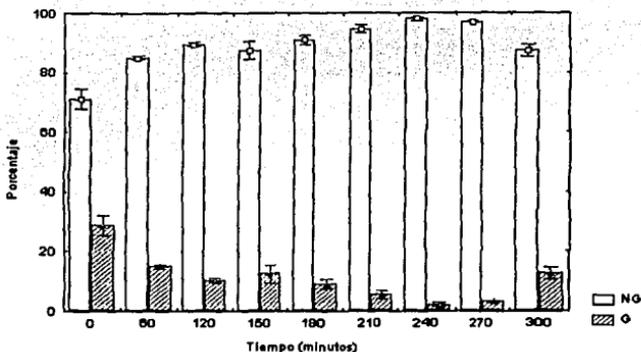


Gráfica 6. Porcentaje de células no gemantes (NG) y gemantes (G) a lo largo de una cinética de arresto con factor α de la cepa silvestre W303a. Los valores correspondientes a la cantidad de células por mililitro de gemantes y no gemantes se encuentran en la tabla 4. Cada muestra representa el promedio de 3 eventos independientes.

Tiempo (minutos)	células / ml		Porcentajes	
	NG	G	NG	G
0	$5.45 \times 10^6 \pm 4.08 \times 10^6$	$5.27 \times 10^6 \pm 3.16 \times 10^6$	51 ± 4	49 ± 3
90	$1.48 \times 10^7 \pm 1.56 \times 10^6$	$5.85 \times 10^6 \pm 3.91 \times 10^6$	71 ± 8	29 ± 2
105	$1.84 \times 10^7 \pm 3.49 \times 10^6$	$3.77 \times 10^6 \pm 1.54 \times 10^6$	83 ± 16	17 ± 7
120	$2.32 \times 10^7 \pm 3.16 \times 10^6$	$3.05 \times 10^6 \pm 6.50 \times 10^5$	88 ± 12	12 ± 2
150	$2.07 \times 10^7 \pm 1.28 \times 10^6$	$1.80 \times 10^6 \pm 3.12 \times 10^5$	92 ± 6	8 ± 1
180	$2.01 \times 10^7 \pm 1.62 \times 10^6$	$2.47 \times 10^6 \pm 7.11 \times 10^5$	89 ± 7	11 ± 3

Tabla 5. Cantidad de células por mililitro de no gemantes (NG) y gemantes (G), así como los porcentajes correspondientes, de la cepa silvestre W303a. Todos los valores incluyen la desviación estándar.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 7. Porcentaje de células no germinantes (NG) y germinantes (G) a lo largo de una cinética de arresto con factor α de la mutante JF337. Los valores correspondientes a la cantidad de células por mililitro de germinantes (G) y no germinantes (NG) se encuentran en la tabla 5. Cada muestra representa el promedio de 3 eventos independientes.

Tiempo (minutos)	células / ml		Porcentajes	
	NG	G	NG	G
0	$6.06 \times 10^6 \pm 1.91 \times 10^6$	$2.46 \times 10^6 \pm 3.27 \times 10^5$	71 ± 2	29 ± 4
60	$8.76 \times 10^6 \pm 5.67 \times 10^6$	$1.54 \times 10^6 \pm 9.10 \times 10^5$	85 ± 6	15 ± 1
120	$1.04 \times 10^7 \pm 4.10 \times 10^6$	$1.22 \times 10^6 \pm 1.07 \times 10^6$	90 ± 4	10 ± 1
150	$9.83 \times 10^6 \pm 1.26 \times 10^6$	$1.39 \times 10^6 \pm 2.50 \times 10^5$	88 ± 11	12 ± 2
180	$1.01 \times 10^7 \pm 4.07 \times 10^6$	$1.00 \times 10^6 \pm 2.33 \times 10^5$	91 ± 4	9 ± 2
210	$1.14 \times 10^7 \pm 5.81 \times 10^6$	$6.56 \times 10^5 \pm 1.71 \times 10^5$	95 ± 5	5 ± 1
240	$1.21 \times 10^7 \pm 2.31 \times 10^6$	$2.67 \times 10^5 \pm 6.67 \times 10^4$	98 ± 2	2 ± 1
270	$1.12 \times 10^7 \pm 6.74 \times 10^6$	$3.44 \times 10^5 \pm 5.09 \times 10^4$	97 ± 6	3 ± 0
300	$9.06 \times 10^6 \pm 1.18 \times 10^6$	$1.30 \times 10^6 \pm 8.62 \times 10^5$	87 ± 11	13 ± 1

Tabla 6. Cantidad de células por mililitro de no germinantes (NG) y germinantes (G), así como y los porcentajes correspondientes, de la cepa mutante JF337. Todos los valores incluyen la desviación estándar.

Una vez determinado el tiempo adecuado de arresto del mayor número de células, tanto en la cepa mutante como en la silvestre, se llevó a cabo el análisis del ciclo cromosomal de ambas cepas.

Cuantificación del DNA en el citómetro de flujo

El citómetro de flujo consiste en un sistema que permite el paso de una sola célula a la vez a través de una corriente que pasa a través de un fino tubo capilar. Al pasar una célula a través de un haz de luz proveniente de un láser, parte de la luz es absorbida por la célula, difractada, refractada o reflejada. La refracción y la reflexión de la luz permiten determinar la estructura celular mientras que la difracción permite definir el tamaño celular. Si previamente las células son teñidas con algún agente fluorescente como el yoduro de propidio capaz de intercalarse en el DNA, el citómetro de flujo cuantifica la cantidad de DNA de cada célula permitiendo el análisis del ciclo cromosomal de una muestra.

El estudio del DNA a través del citómetro de flujo considera que la cantidad de DNA es directamente proporcional a la cantidad de fluorescencia por cada célula, por lo que este aparato puede distinguir a las células haploides o en fase de transición G0 / G1 y a las diploides o en fase de transición G2/M, así como a las células en un estado de ploidía intermedio (en fase S). Sin embargo, la fase S de las células de levadura del pan es difícil de detectar debido a su corta duración (Lew *et al.*, 1997), por lo que no se consideró en este estudio.

El estudio del ciclo cromosomal se realizó a partir de cultivos sincronizados cuyas células se habían detenido en la fase G1 por medio del factor α y posteriormente fueron liberados del arresto. A través de un citómetro de flujo se examinó la proporción de células haploides o en la fase de transición G0/G1 así como la proporción de células en la etapa diploide o fase de transición M / G2 (véase materiales y métodos).

Los resultados del análisis en el citómetro de flujo de la cepa silvestre, W303 indicaron que al remover del medio la hormona de apareamiento disminuye el porcentaje de las células en fase de transición G0/G1 (ver figura 1, tabla 7). En contraste, el porcentaje de las células en fase de transición M / G2 se incrementó. El punto en el cual la proporción de las células de ambas fases es aproximadamente el 50% se alcanzó a los 75 minutos. La cantidad de células en la fase de transición G0 / G1 continuó disminuyendo hasta los 120 minutos, de manera recíproca, la máxima proporción de células en G2 / M se alcanzó a los 120 minutos, tiempo que corresponde al tiempo de duplicación.

En la cepa mutante JF337 la proporción de células en la fase G0 / G1 llegó al 90% debido a la adición del factor α (ver figura 2, tabla 8). La proporción de células en la fase G0 / G1 disminuyó a un 50% después de los 180 minutos de haber lavado el factor α , 105 minutos después que la cepa silvestre.

A partir de los 180 minutos la cantidad de células diploides disminuyó y se incrementó el número de células haploides o en fase G0 /G1. Esto implica que el porcentaje máximo obtenido por las células en la fase G2 / M después de lavar el factor α fue del 50%. En contraste, la cepa silvestre alcanzó hasta el 68% en G2 / M, a los 120 minutos.

Aunque en este experimento no se arresaron a todas las células en G1 con factor α , los resultados indicaron que la cepa mutante pasa un mayor tiempo en la fase de transición G0 / G1 que la cepa silvestre.

Estos resultados aunados a los datos obtenidos del análisis del ciclo citoplasmático, indican la existencia de una alteración en el ciclo celular que le confiere a la cepa mutante JF337 su fenotipo de crecimiento lento.

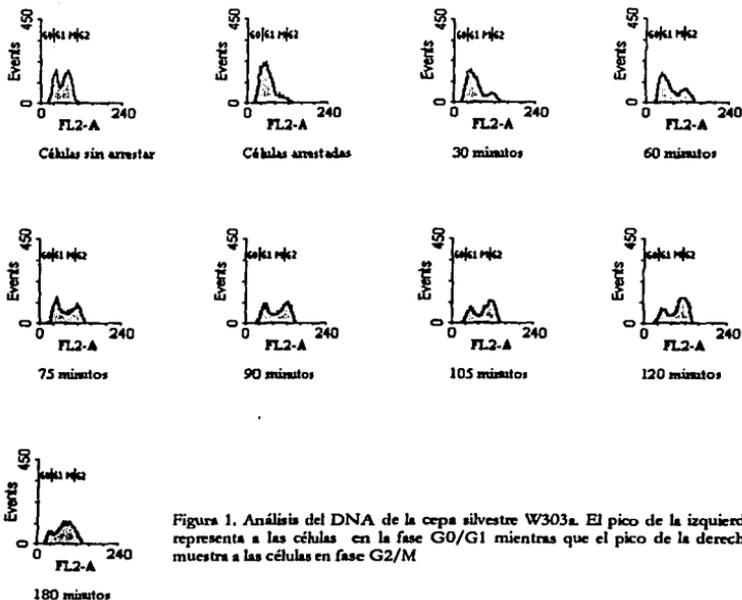


Figura 1. Análisis del DNA de la cepa silvestre W303a. El pico de la izquierda representa a las células en la fase G0/G1 mientras que el pico de la derecha muestra a las células en fase G2/M

Tiempo (minutos)	% No. de células	
	G0 / G1	M / G2
Células sin arrestar	60 ±16	40 ±4
Células arrestadas	84 ±20	16 ±3
30*	74 ±18	26 ±4
60*	63 ±14	37 ±6
75*	49 ±11	51 ±7
90*	40 ±8	60 ±8
105*	35 ±7	65 ±9
120*	32 ±7	68 ±9
180*	43 ±12	57 ±8

Tabla 6. Cuantificación de la proporción de las células haploides correspondientes a la fase G0/G1 y las células diploides correspondientes a la fase M / G2 de la cepa silvestre, W303a. Estos datos corresponden a los mostrados en la figura 1.

* Muestras liberadas del arresto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

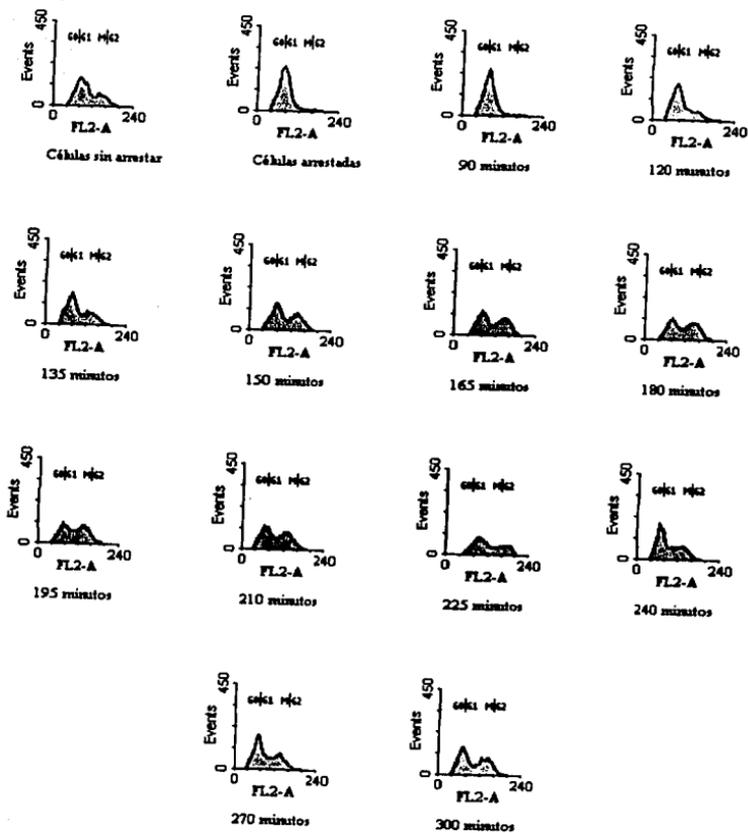


Figura 2. Análisis del DNA de la cepa mutante *ak25-21*, JF337. El pico de la izquierda representa a las células en la fase G0/G1 mientras que el pico de la derecha muestra a las células en fase G2/M

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tiempo (minutos)	% No. de células	
	G0 / G1	M / G2
Células sin arrestar	67 ±13	34 ±5
Células arrestadas	90 ±19	10 ±2
90*	92 ±19	8 ±1
120*	80 ±18	20 ±3
135*	67 ±14	33 ±4
150*	59 ±13	41 ±5
165*	52 ±10	48 ±6
180*	50 ±10	50 ±6
195*	52 ±12	48 ±6
210*	61 ±16	39 ±5
225*	48 ±8	52 ±9
240*	68 ±16	32 ±4
270*	67 ±16	33 ±4
300*	59 ±13	41 ±5

Tabla 8. Cuantificación de la proporción de las células haploides correspondientes a la fase G0/G1 y las células diploides correspondientes a la fase M/G2. Cepa mutante, JF337. Estos resultados corresponden a los mostrados en la figura 2.

* Muestras liberadas del arresto

DISCUSIÓN

Determinación de la frecuencia de reversión

Considerando que el fenotipo de colonia pequeña de la mutante *cdc25-21* puede revertir adquiriendo un tamaño de colonia similar al de la cepa silvestre (Casas, 1998) se realizó un análisis de la frecuencia de reversión de este fenotipo.

En un estudio anterior, realizado por Casas – Flores (1998) se determinó que la frecuencia de reversión de la cepa mutante ScIBT2, de la cual proviene la mutante *cdc25-21*, es de 7×10^{-3} , un porcentaje considerablemente mayor al fenómeno de reversión espontánea que ha sido reportado: 1×10^{-9} a 1×10^{-6} . El análisis realizado por Casas fue un estudio cuantitativo de este fenómeno en cultivos en fase logarítmica, con una D.O $_{600\text{ nm}}$ entre 0.4 – 0.6 y en medio YPDA. Las colonias analizadas se obtuvieron con una asa microbiológica, lo cual no es una forma adecuada para tomar muestras homogéneas, por lo que se decidió modificar la estrategia experimental.

En este estudio se utilizaron colonias completas crecidas a partir de una sola célula por medio de micromanipulación. Se analizó la tasa de reversión durante el crecimiento de cada colonia. Para esto, las colonias fueron recortadas del medio circundante a cada una de ellas resuspendiéndose en el menor volumen posible de agua destilada estéril. Las diluciones obtenidas a partir de estas muestras fueron plateadas por completo. Dado que se había observado una diferencia en la cantidad de revertantes obtenida en medio mínimo y en medio YPDA, se decidió analizar este fenómeno en ambos medios con mayor precisión.

La frecuencia de reversión obtenida en YPDA, presenta un comportamiento diferente en cada colonia. Por ejemplo en medio rico se presentan varios eventos de reversión con una frecuencia que fluctúa entre 0 hasta 1.97×10^3 . Este último dato indica una frecuencia de reversión mayor a la indicada por Casas-Flores: 7×10^3 . En cambio, la frecuencia de reversión en medio mínimo que varía de 0 a 7.25×10^4 indicando una frecuencia de reversión menor a la hallada en medio rico, tanto por Casas – Flores como en este estudio.

Los resultados del presente trabajo sugieren que en medio sólido el tiempo el tiempo de duplicación de la cepa JF337 es un poco más largo en medio mínimo pero no se duplica en relación al tiempo en YPDA, como en los cultivos líquidos.

Valdría la pena repetir este experimento con más muestras y tener un mejor cuidado en la manipulación de la cepa, ya que uno de los problemas presentes en este estudio fue la contaminación de las muestras. Además sería más correcto coleccionar las muestras en tiempos equivalentes para ambos tipos de medio.

Análisis del ciclo celular

Como ya se ha mencionado, la mutante *cdc25-21* codifica una proteína Cdc25 truncada a la cual le faltan 612 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal, donde reside el dominio catalítico. Entre otras características, esta mutante presenta un tiempo de duplicación mayor que la cepa silvestre (Folch *et al.*, 1999). Con base a estas observaciones se decidió analizar su ciclo celular para determinar si existe alguna alteración durante este proceso que explique la larga duración del tiempo de duplicación. Para ello se analizaron dos de los tres

ciclos incluidos en el proceso de división celular de la levadura del pan: el ciclo citoplasmático, que consiste en la formación de la gema, y el ciclo cromosomal en el cual se duplican y se separan los cromosomas (Lew *et al.*, 1997).

Análisis del ciclo citoplasmático

Al realizar el estudio del ciclo citoplasmático de la cepa mutante *cdc25-21* (JF337) se observó que aproximadamente el 70% de las células se mantenían en un estado no gemante a lo largo de la curva de crecimiento. Mientras que la cepa silvestre presenta un porcentaje de células no gemantes del 50%. En ambas cepas la cantidad de células sin gema se incrementa en un 20% durante la fase postdiáuxica, alcanzando la cepa JF337 el 90% y la cepa W303a el 70%. Estos resultados indican que la proporción de células mutantes en estado no gemante es mayor a lo largo de toda la curva del crecimiento que la de la cepa silvestre.

Se han sugerido dos modelos para explicar el lento crecimiento de la cepa JF337 considerando que la gema se forma después de pasar el punto de inicio (Murray *et al.*, 1993) y las características de fase estacionaria que presenta: una alta termotolerancia, una pared celular gruesa y una alta acumulación de glucógeno (Folch-Mallol *et al.*, 1999). El primero considera que una parte de la población se encuentra arrestada en G₀, período en el cual no hay proliferación celular (Werner – Washburne *et al.*, 1993). Esto implicaría que las células en la fase G₀ son las que le confieren a la cepa sus características de fase estacionaria; mientras que las células restantes siguen dividiéndose durante todo el ciclo de cultivo, lo que explicaría su crecimiento lento. El segundo modelo plantea que todas las células presentan un ciclo celular más largo ya que se arrestan en la fase G₀ / G₁, lo que explicaría las características de fase estacionaria y el crecimiento lento de la cepa mutante. Con el objeto de dilucidar cuál de los dos modelos es correcto, se decidió analizar el ciclo cromosomal de la cepa mutante y compararlo con el de la cepa silvestre.

Análisis del ciclo cromosomal

Para monitorear el ciclo celular de las cepas JF337 y W303a se decidió sincronizar los cultivos en la fase G₁, mediante la hormona de apareamiento denominada factor α , la cual al

ser removida del medio de cultivo permite que las células prosigan con el ciclo celular y se dividan simultáneamente.

Los resultados de las pruebas de arresto con el factor α indican que el mejor tiempo para la cepa silvestre (W303a) es de 150 minutos y para la cepa mutante (JF337) es de 240 minutos. Estos tiempos de arresto se aproximan a la duración del ciclo de duplicación de cada cepa, lo que puede explicarse considerando la existencia de algunas células que ya se han comprometido a completar el ciclo celular. Pasando la fase G1 la hormona de apareamiento solo puede actuar sobre ellas hasta que regresen a esta fase del ciclo celular, después de haberse cumplido un ciclo de duplicación.

Una vez determinado el tiempo de arresto se llevó a cabo el análisis del ciclo cromosómico. En este trabajo se pudo observar que las células *cdc25 - 21* presentan una fase G0 / G1 mucho más larga que la cepa W303a. Esto se pudo observar al comparar los tiempos en los cuales se alcanza el 50 % en la fase G2 / M. En el caso de la cepa silvestre fue a los 75 minutos; mientras que en la mutante se alcanzó este punto a los 180 minutos. A pesar de que una pequeña cantidad de células no fue sincronizada con el factor α , se puede inferir que todas las células mutantes se arrestan en la fase G0 / G1.

Para conseguir un 100 % de arresto en G0 / G1 se podría incrementar la concentración de factor α . O bien, se puede utilizar una metodología de sincronización diferente y más eficiente, como es el de elutriación, un método que consiste en la separación de las células por tamaño; aunque es un método que utiliza un aparato muy complejo y muy costoso (Fantes *et al.*, 1993).

Los resultados de los estudios del ciclo citoplasmático y del cromosomal de la cepa mutante *cdc25 - 21*, JF337 mostraron que existe una alteración en el ciclo celular de esta cepa ya que presenta una fase G0 / G1 más larga. Suponemos que este trastorno del ciclo celular puede deberse a que la alteración del gen *CDC25* repercute en el funcionamiento de la vía Ras - cAMP (Broek *et al.*, 1987; Lai *et al.*, 1993), y a su vez sobre la traducción de las ciclinas de la fase G1 (Pedruzzi *et al.*, 2002), las cuales junto con Cdc28 permiten el paso a través del punto de inicio (Hubler *et al.*, 1993).

En estudios posteriores se demostró que todas las células *cdc25-21* tienen una fase G1 más larga que la normal pero no entran en G0 durante la fase exponencial (Folch *et al.*, 1999). Con el objeto de determinar si todas las células se arrestan o no, se determinó el tiempo de duplicación a partir de células individuales no germinantes de cultivos en fase exponencial y en fase estacionaria. Todas las células, separadas a través de un micromanipulador, gemaron 4 horas después de la disección. Esto indica que todas las células se arrestan en G0 / G1.

Para definir en cuál fase se arrestan las células, G0 o G1, la mutante *cdc25-21* fue cruzada con la mutante *gs1*, que muestra un fenotipo condicional de no proliferación a 14°C si las células han entrado previamente a la fase estacionaria. Sin embargo, cuando es transferida durante la fase exponencial de 25°C a 14°C continúa con su crecimiento. Al evaluar el fenotipo de la doble mutante *hvr2 gs1* después de crecer a 25°C y cambiarla a 14°C durante la fase exponencial se observó que la doble mutante no podía crecer. Estos resultados descartan la posibilidad de un arresto en G0, señalando que la cepa *cdc25-21* se arresta en la fase G1 (Folch *et al.*, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

- EL CICLO CELULAR DE LA CEPA *cdc25-21*, JF337, ESTÁ ALTERADO A NIVEL DEL CICLO CITOPASMÁTICO Y DEL CICLO CROMOSOMAL, YA QUE PRESENTA UNA FASE G₀ / G₁ MÁS LARGA.
- EN ESTA INVESTIGACIÓN NO SE PUDO DETERMINAR SI TODAS LAS CÉLULAS SE ARRESTAN EN LA FASE G₀ / G₁. O BIEN, SI TODAS LAS CÉLULAS SE ENCUENTRAN EN G₀
- LA FRECUENCIA DE REVERSIÓN EN LA CEPA *cdc25-21*, JF337, NO HA SIDO BIEN DETERMINADA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (Eds.) 1996. *Biología molecular de la célula* 3a. ed. Ediciones Omega, Barcelona.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., 1993. *Microbiología* 6a. (Ed). Prentice May Hispanoamericana S.A, México.
- Broek, D., Toda T., Michaeli T., Levin L., Birchmeier C., Zoller M., Powers S., and Wigler M. (1987). The *S. cerevisiae CDC25* gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* **48**: 789-799.
- Casas, S.F., Folch-Mallol, J.L., Martínez, L.M., Nieto-Sotelo, J. 1996. Caracterización genética y molecular de mutantes con termotolerancia constitutiva de la levadura *Saacharomyces cerevisiae*. Memorias del XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Manzanillo, Colima.
- Casas-Flores, J. S. 1998. "Caracterización genética y molecular de mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada de la levadura *Saacharomyces cerevisiae*". Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímica). Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Corkidi, G., Díaz-Urbe, R., Folch-Mallol, J.L., Nieto-Sotelo, J. 1998. COVASIAM: an image analysis method that allows detection of confluent microbial colonies and colonies of various sizes for automated counting. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(4): 1400-1404.
- Deacon J.W. 1988. *Introducción a la micología moderna*. Editorial Limusa, S.A de C.V. México.
- Draper, N., Smith. H. (Eds.) 1981. *Applied regression analysis*. 2nd ed. Wiley - Interscience, New York.
- Estruch, F. 2000. Stress controlled transcription factors, stress induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:469-486.
- Fantes P., Brooks, R. 1993. *The cell cycle: a practical approach*. Oxford University Press.
- Fedor-Chaiken, M., Deschenes, R.J. and Broach, J. R. (1990). *SVR2*, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase. *Cell* **61**: 329-340.
- Folch-Mallol, J.L., Martínez-Mejía, L.M., Casas, S., Ventura, L., Nieto-Sotelo, J. 1999. Characterization of intrinsically thermotolerant mutants in the yeast *Saacharomyces cerevisiae*. XIX International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Rimini, Italy. *Current Genetics* 34 (3-4): 387.
- Folch-Mallol J.L., Casas S.J., Ventura L., Yang R., Hemández A., Martínez L.M., Nieto-Sotelo, J. 2000. Análisis fisiológico y molecular de mutantes intrínsecamente termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae*. 1er Congreso de Responsables de Proyecto de Investigación en Ciencias Naturales organizado por CONACYT. Veracruz, Ver. del 8 al 11 de Octubre de 2000. Artículo *in extenso*, 8 páginas
- Geymonat, M., Wang, L., Garreau, H. and Jacquet, M. 1998. Ssa1p chaperone interacts with the guanine exchange factor of Ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 30: 855-864.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W. M. 1998. *Genética* 5a. ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(4): 1264 – 1300.
- Guthrie, C., Fink, G.R. (ed) 1991. *Methods in Enzymology Vol 194: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press Inc. San diego, California.
- Hall, D.D., Markwardt, D.D., Parviz, F., Heideman W. 1998. Regulation of the Cln3 – Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 17(15): 4370- 4378.
- Hubler, L., Bradshaw-Rouse, J., Herideman, W. 1993 Connections between the Ras-Cyclic AMP pathway and G1 cyclin expression in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 13(10): 6274-6282.
- Iida, H., Yahara, I. 1984. Specific early-G1 blocks accompanied with stringent response in *Saccharomyces cerevisiae* lead to growth arrest in resting state similar to the G0 of higher eucaryotes. *The Journal of Cell Biology* 98: 1185-1193.
- Lai, C-C., Boguski, M., Broek, D. and Powers, S. (1993). Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and Cdc25 proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1345-1352.
- Lew, D.J., Weinert, T., Pringle, J.R. 1997 Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. P.p. 607-695 en (Ed.) *Yeast III* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y
- Lewin, B. M. 1997. *Genes VI*. Oxford University. Oxford.
- Ma, P., Wera, S., Van Dick, P. and Thevelein, J.M. (1999). The *PDE1* encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signalling. *Mol. Biol. Cell.* 10: 91-104.

- Mager, W.H., Moradas-Ferreira, P. 1993. Stress response of yeast. *Biochem. J.* 290: 1-13.
- Márquez-Guzmán, J. (Ed) 1985. *Biología celular; Manual de prácticas 2.* Facultad de ciencias, UNAM. México D.F.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 2000. *Bioquímica 2da ed.* McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Morano, K.A., Santoro, N., Koch, K.A., Thiele, D.J. 1999. A trans-activation domain in yeast heat shock transcription factor is essential for cell cycle progression during stress. *Molecular and Cellular Biology.* 19(1): 402-411.
- Murray, A., Hunt. T. 1993. *The cell cycle: an introduction.* Oxford University Press. Nueva York.
- Pagano, M., Gauvreau, K. 2001. *Fundamentos de bioestadística .* Thompson Learning.
- Peduzzi, I., Bürckert, N., Egger, P., De Virgilio, C. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1 *The EMBO Journal* 19(11): 2569-2579.
- Plesset, J., Ludwig, J.R., Cox, B.S., McLaughlin, C.S. (1987). Effect of cell cycle position on thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169: 779-784.
- Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Wemer-Washburne, M., Singer, R.A. 1993. Heat shock - mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology.* 13(2): 1034-1041.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T., (Eds) 1989. *Molecular Cloning 2da. ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Thevelein, J. M. 1992. The Ras-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 62: 109-130 pp.
- Thevelein, J. M. y De Winde, J.H. 1999. Novel sensing mechanism and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 33(5): 904-918.
- Thevelein, J. M. Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J.H., Donatoni, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Ma, P., Nauwelaers, D., Rolland, F., Teunissen, A., Van Dijck, P., Versele, M., Wera, S., Winderickx, J. 2000. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 819-825.

- Van Aelst, I., Boy-Marcotte, E., Camonis, J.H., Thevelein, J.M., Jacquet, M. 1990. The C-terminal part of the CDC25 gene product plays a key role in signal transduction in the glucose-induced modulation of cAMP level in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **190**: 675-680.
- Walton, E.F., J.R. Pringle. 1980. Effect of growth temperature upon heat sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **124**: 285-287.
- Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G.C., and R.A. Singer. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **57**: 383-401.

ANEXO 1

Ajuste de los detectores y amplificadores del voltaje para el citómetro de flujo

P1	FSC	E00	287	lin
P2	SSC	429	1.00	lin
P3	TL1	665	1.00	lin
P4	FL2	600	1.00	log
P5	FL3	623	1.00	lin
P6	FL2-A		1.00	lin
P7	LL2-W		1.00	lin

Valores de compensación para el citómetro de flujo

FL1	1.4%	FL2
FL2	33%	FL1
FL2	0.0%	FL3
FL3	0.0%	FL2

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANEXO 2

Análisis de varianza de la cepa W303a a lo largo de la cinética del crecimiento

No gemantes				
Tiempo (horas)	D.O. 600 nm	Cantidad de muestras	Media	(min-max)
6	1.14	3	51.98 ±3.25	48.74 - 55.23
8	1.26	3	52.84 ±3.30	49.53 - 56.14
7	1.21	3	52.90 ±1.52	51.38 - 54.42
1	0.28	3	53.19 ±2.33	50.86 - 55.52
4	0.72	3	55.49 ±0.68	54.82 - 56.17
5	0.87	3	56.10 ±1.32	54.78 - 57.42
2	0.44	3	56.98 ±1.69	55.29 - 58.66
3	0.56	3	57.02 ±2.37	54.65 - 59.39
9	1.51	3	69.77 ±2.29	67.48 - 72.07

Gemantes				
Tiempo (horas)	D.O. 600 nm	Cantidad de muestras	Media	(min-max)
9	1.51	3	30.23 ±2.29	27.93 - 32.52
3	0.56	3	42.98 ±2.37	40.60 - 45.35
2	0.44	3	43.02 ±1.69	41.34 - 44.71
5	0.87	3	43.90 ±1.32	42.58 - 45.22
4	0.72	3	44.51 ±0.68	43.83 - 45.18
1	0.28	3	46.81 ±2.33	44.48 - 49.14
7	1.21	3	47.10 ±1.52	45.58 - 48.62
8	1.26	3	47.16 ±3.30	43.86 - 50.47
6	1.14	3	48.02 ±3.25	44.77 - 51.26

En ambas tablas, las muestras fueron ordenadas con base a su media para poder observar las similitudes entre ellas a través de las líneas colocadas en la parte derecha de la tabla, para determinar si existe o no una diferencia significativa entre ellas.

Prueba de T pareada de la cepa W303a a lo largo de la cinética del crecimiento

D.O. 600 nm	P
0.28	0.14101898
0.44	0.01896032
0.56	0.03600589
0.72	0.00502667
0.87	0.01526395
1.14	0.40131804
1.21	0.08041861
1.26	0.27544215
1.51	0.00445048

Con un intervalo de confianza del 99% para determinar si existe alguna diferencia entre la proporción de gemantes y no gemantes en cada punto de la curva del crecimiento de la cepa W303a. Cuando $p < 0.01$ la diferencia es significativa, los valores marcados con negritas muestra los valores menores a 0.01.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 3

Análisis de varianza de la cepa JF337 a lo largo de la cinética del crecimiento

No gemantes				
Tiempo (horas)	D.O. 600 nm	Cantidad de muestras	Media	(min-max)
5	0.6	3	71.54 ±3.76	67.78 - 75.30
1	0.34	3	73.09 ±0.49	72.60 - 73.57
2	0.4	3	73.47 ±4.27	69.20 - 77.74
4	0.54	3	76.39 ±0.47	75.92 - 76.86
3	0.47	3	76.82 ±0.87	75.95 - 77.69
6	0.77	3	78.39 ±2.94	75.44 - 81.33
7	0.84	3	80.01 ±1.10	78.91 - 81.10
8	0.91	3	81.11 ±1.09	80.03 - 82.20
9	1.54	3	93.85 ±1.85	92.01 - 95.70

Gemantes				
Tiempo (horas)	D.O. 600 nm	Cantidad de muestras	Media	(min-max)
9	1.54	3	6.15 ±1.85	4.30 - 7.99
8	0.91	3	18.89 ±1.09	17.80 - 19.97
7	0.84	3	19.99 ±1.10	18.90 - 21.08
6	0.77	3	21.61 ±2.94	18.67 - 24.55
3	0.47	3	23.18 ±0.87	22.31 - 24.04
4	0.54	3	23.61 ±0.47	23.14 - 24.07
2	0.4	3	26.53 ±4.27	22.26 - 30.79
1	0.34	3	26.91 ±0.49	26.43 - 27.40
5	0.6	3	28.48 ±3.76	24.70 - 32.21

En ambas tablas, las muestras fueron ordenadas con base a su media para poder observar las similitudes entre ellas a través de las líneas colocadas en la parte derecha de la tabla, para determinar si existe o no una diferencia significativa entre ellas.

Prueba de T pareada de la cepa JF337 a lo largo de la cinética del crecimiento

D.O. 600 nm	p
0.34	0.00014922
0.40	0.01083919
0.47	0.00034885
0.54	0.00010517
0.60	0.00999798
0.77	0.00356718
0.84	0.00044423
0.91	0.00040779
1.54	0.00059124

Con un intervalo de confianza del 99% para determinar si existe alguna diferencia entre la proporción de gemantes y no gemantes en cada punto de la curva del crecimiento de la cepa JF337. Cuando $p < 0.01$ la diferencia es significativa, los valores marcados con negritas muestran los valores menores a 0.01.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 4

Análisis de varianza de la cepa W303a en una curva de arresto con hormona de apareamiento

No gemantes			
Tiempo (minutos)	Cantidad de muestras	Media	(min-max)
0	3	50.82 \pm 3.04	47.78 - 53.86
90	3	71.19 \pm 3.45	67.74 - 74.64
105	3	83.49 \pm 4.28	79.21 - 87.77
120	3	88.36 \pm 2.16	86.20 - 90.51
180	3	89.17 \pm 2.38	86.79 - 91.55
150	3	91.97 \pm 1.42	90.56 - 93.39

Las muestras fueron ordenadas con base a su media para poder observar las similitudes entre ellas a través de las líneas colocadas en la parte derecha de la tabla. Para determinar si existe o no una diferencia significativa entre ellas.

ANEXO 5

Análisis de varianza de la cepa JF337 en una curva de arresto con hormona de apareamiento

No gemantes			
Tiempo (minutos)	Cantidad de muestras	Media	(min-max)
0	3	71.23 \pm 3.38	67.85 - 74.61
60	3	85.06 \pm 0.63	84.43 - 85.68
300	3	87.34 \pm 0.50	85.39 - 89.29
150	3	87.49 \pm 2.91	84.58 - 90.40
120	3	89.53 \pm 1.58	89.03 - 90.02
180	3	91.01 \pm 1.32	89.42 - 92.59
210	3	94.57 \pm 0.49	93.24 - 95.89
270	3	97.02 \pm 0.32	96.70 - 97.34
240	3	97.84 \pm 1.95	97.35 - 98.34

Las muestras fueron ordenadas con base a su media para poder observar las similitudes entre ellas a través de las líneas colocadas en la parte derecha de la tabla. Para determinar si existe o no una diferencia significativa entre ellas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 6

Análisis estadístico de la frecuencia de reversión en medio YPDA y medio mínimo

Tiempo (horas)	YPDA		Medio mínimo		p	v
	N	media	N	Media		
30	2	157 ±7	2	4413 ±6 170	0.43219636	2
42	3	3 245 ±1 945	2	1090 ±156	0.20876828	3
48	3	7 570 ±4 473	3	12 466 ±9 758	0.27247095	4
72	3	325 000 ±117 793	3	204300 ±36 465	0.16685461	4

En esta tabla se puede observar la cantidad de repeticiones (N) analizadas por cada muestra y la media de cada muestra. Además se puede observar los resultados de pruebas de T con (v) grados de libertad, para muestras independientes realizada para comparar el crecimiento en las muestras tanto en medio YPDA como en medio mínimo y discernir si existe una diferencia entre ellas o no en cada lapso de tiempo de crecimiento. Para ello se especificó como hipótesis nula que las medias de ambas muestras son iguales. En contraste, se estableció como hipótesis alternativa que las medias son diferentes. La hipótesis nula se cumple si $p > \alpha$ o se rechaza si $p < \alpha$, siendo $\alpha = 0.05$.